
Legionella-Wirtszell-Interaktionen und Analyse neuer Wirkstoffe und Wirkstoffträger

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Frederike Lisa Drawert
aus Celle

1. Referentin oder Referent:

2. Referentin oder Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Professor Dr. Michael Steinert

apl. Professor Dr. Manfred Rohde

27.03.2013.....

27.05.2013.....

Druckjahr 2013

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Ünal, C., Schwedhelm, K.F., Thiele, A., Weiward, M., Schweimer, K., Frese, F., Fischer, G., Hacker, J., Faber, C., Steinert, M. Collagen IV-derived peptide binds hydrophobic cavity of *Legionella pneumophila* Mip and interferes with bacterial epithelial transmigration. *Cellular Microbiology* 13(19):1558-1572 (2011).

Riyahi, T.Y., Frese, F., Steinert, M., Omosigh, N.N., Glöckner, G., Eichinger, L., Orabi, B., Williams, R.S.B., Noegel, A.A. RpkA, a highly conserved GPCR with a lipid kinase domain has a role in pathogenesis and anti-bacterial defense. *PLoS One* 6(11): e27311 (2011).

Tagungsbeiträge

Frese F., Tiefenau J., Ünal C., Faber C., Kamphausen T., Wagner C., Khan A.S., Fischer G., Hacker J., Steinert M. Molecular understanding of Mip-Collagen interaction and implications for drug development (Poster & Vortrag). Conference of the European Association of Pharma Biotechnology (EAPB), Hannover (2008).

Tiefenau, J., Frese, F., Galka, F., Nyunt Wai, S., Engelmann, S., Steinert, M. Destructive enzyme activities in the secretome of *Legionella pneumophila* (Poster & Abstract book). *Legionella* 2009, Paris (2009).

Frese, F., Tiefenau, J., Galka, F., Nyunt Wai, S., Engelmann, S., Steinert, M. Proteomic and functional analysis of *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles (Poster). 3rd Joint Conference German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM) and Association for General and applied Microbiology (VAAM), Hannover (2010).

Tiefenau, J., Frese, F., Rahim, H.A., Wang, H., Laatsch, H., Steinert, M. Specific inhibition of *Legionella* by compounds isolated from *Bacillus licheniformis* and *B. pumilus* (Poster). 6. Joint Ph.D. Students Meeting of SFB 630, 766, 544, Ellwangen (2010).

Tiefenau, J., Frese, F., Rohde, M., Steinert, M. Biological activity of *Bacillus* extracts against *Legionella* (Poster). DGHM, Essen (2011).

Wang, H., Talontsi Mufo, F., Frese, F., Steinert, M., Zou, J., Laatsch, H. 1-pentadecanoyl—3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-glycerol, a new glycolipid from *Bacillus pumilus* (Poster). JCF Göttingen, Göttingen (2011).

Danksagung

Prof. Michael Steinert möchte ich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung während meiner Doktorarbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und den unerschöpflichen Optimismus sowie den wissenschaftlichen Freiraum bedanken, ohne den das *Bacillus*-Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Prof. Manfred Rohde und Prof. Andre Fleißner danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und des Prüfungsvorsitzes,

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern Prof. Angelika Nögel, Prof. Ludwig Eichinger, Dr. Tanja Riyahi von der Universität Köln, Prof. Hartmut Laatsch und Dr. Hongpeng Wang von der Universität Göttingen sowie Dr. Matthias Weiward und Dr. Alexandra Thiele von der Universität Halle für die freundschaftliche und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Der Firma Rodos BioTarget GmbH danke ich für die Entwicklung und Dr. Martin Holzer von der Universität Freiburg für die Bereitstellung der Liposomen.

Meinen Studenten Johannes, Dennis und Ann-Christin möchte ich herzlich für ihren Einsatz, der Freude an der Forschung und für die schöne gemeinsame Zeit danken.

Karin Münch danke ich für die Auswertung der Real Time-PCR.

Ein großes Dankeschön gilt der AG Steinert für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die vielen lustigen Abende auch außerhalb der Uni. Insbesondere bei Jana, Gabi, Chris, Corina, Quinxu, Janine, Jens, Can und Simone möchte ich mich für anregende Diskussionen, die gemeinsame Entwicklung von Versuchen, die gegenseitige Motivation und Freundschaft bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann Frieder, die mich während meiner Promotion in allen Lebenslagen herzlich unterstützt haben.

"The beginning of knowledge is the discovery of something we do not understand".

Frank Herbert (1920-1986)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	1
1.1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.2 SUMMARY	3
2 EINLEITUNG.....	5
2.1 BIOLOGIE, ÖKOLOGIE UND EPIDEMIOLOGIE VON LEGIONELLEN	5
2.2 DAS MENSCHLICHE IMMUNSYSTEM	6
2.2.1 Interaktion von Legionella mit dem Wirts-Immunsystem.....	8
2.2.2 Interaktion von Legionella mit polymorphkernigen Leukozyten	9
2.2.3 Neutrophile extrazelluläre Fallen.....	11
2.2.4 Virulenzfaktoren und intrazellulärer Lebenszyklus von Legionella	14
2.3 DER WIRTSMODELLORGANISMUS <i>Dictyostelium discoideum</i>	19
2.3.1 Der Phosphoinositid-Metabolismus.....	22
2.3.2 Autophagie	24
2.3.3 Mechanismus und Regulation der Autophagie	25
2.3.4 Autophagie und Interaktionen mit pathogenen Bakterien	29
2.4 THERAPIEMÖGLICHKEITEN ZUR BEKÄMPFUNG INTRAZELLULÄRER PATHOGENE	30
2.4.1 Liposomen als Wirkstoffträgersystem	30
2.4.2 Vorteile von Liposomen in der medizinischen Anwendung.....	33
2.4.3 Herstellung von Liposomen.....	34
3 ZIELSETZUNG.....	36
4 MATERIAL UND METHODEN	37
4.1 GERÄTE UND CHEMIKALIEN	37
4.1.1 Geräte.....	37
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	38
4.1.3 Chemikalien.....	39
4.1.4 Antibiotika und Medienzusätze.....	40
4.1.5 Antikörper	40
4.1.6 Bakterienstämme.....	41
4.1.7 Eukaryotische Zellen und Zell-Linien	43
4.1.8 Gräser, Pilze und Algen	44
4.2 KULTIVIERUNG UND KONSERVIERUNG VON BAKTERIEN.....	44
4.2.1 Kultivierung von Bakterien.....	44
4.2.2 Konservierung von Bakterien	46

4.3	EXTRAKTIONSMETHODEN ZUR GEWINNUNG VON REINSUBSTANZEN AUS <i>BACILLUS PUMILUS</i>	46
4.4	CHARAKTERISIERUNG VON <i>B. PUMILUS</i> DKS1 ROHEXTRAKT	50
4.4.1	Dünnschichtchromatographie.....	50
4.4.2	Temperatur- und pH-Stabilität.....	53
4.4.3	Biologisches Screening von Extrakten.....	53
4.5	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	56
4.5.1	Transformation von <i>Legionella</i>	56
4.5.2	Identifizierung von Bakterien (16 S rRNA)	57
4.5.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	58
4.5.4	RNA-Isolation aus polymorphkernigen Leukozyten	58
4.5.5	RNA-Integrität.....	59
4.5.6	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	60
4.5.7	Primer Design.....	60
4.5.8	Quantitative Real Time-PCR.....	63
4.6	ZELLKULTUR	65
4.6.1	Kultivierung und Konservierung von NCI-H292 Lungenepithelzellen	65
4.6.2	Kultivierung und Differenzierung von U937-Makrophagen	66
4.6.3	Isolation und Differenzierung von mononuklearen Zellen.....	67
4.6.4	Isolation von polymorphkernigen Leukozyten	69
4.6.5	Kultivierung und Konservierung von <i>Dictyostelium discoideum</i>	70
4.6.6	Zytotoxizitäts-Assay (Alamar blue).....	72
4.7	INFEKTIONSSTUDIEN.....	73
4.7.1	Infektion von Lungenepithelzellen und Makrophagen.....	73
4.7.2	Infektion von polymorphkernigen Leukozyten.....	75
4.7.3	Induktion von neutrophil extracellular traps bei polymorphkernigen Leukozyten .	78
4.7.4	Infektion von <i>Dictyostelium discoideum</i> mit <i>Legionella</i>	79
4.8	MIKROSKOPIE UND IMMUNFLUORESCENZ	82
4.8.1	Rhodamin-Färbung von Bakterien	82
4.8.2	Transmissionselektronen Mikroskopie	82
4.8.3	Immunfluoreszenz	83
5	ERGEBNISSE	86
5.1	DIE ROLLE VON PMNs IN DER INFEKTION MIT <i>L. PNEUMOPHILA</i>	86
5.1.1	Infektionsstudien in humanen Lungenepithelzellen, Makrophagen-Zell-Linien sowie Makrophagen und PMNs aus humanem Blut	86
5.1.2	qRT-PCR-Studien zur Analyse spezifischer Wirtsgene während der <i>Legionella</i> - Infektion von PMNs	91
5.1.3	Die Rolle von NETs in der Infektion mit <i>L. pneumophila</i>	95
5.2	<i>Dictyostelium discoideum</i> ALS WIRTSMODELLORGANISMUS.....	98
5.2.1	Die Rolle von RpkA in der <i>Legionella</i> -Infektion.....	99

5.2.2	Die Rolle von Atg9 in der Legionella-Infektion	103
5.2.3	Die Rolle der AAA-ATPase CdcD in der Legionella-Infektion.....	107
5.3	ISOLATION UND CHARAKTERISIERUNG VON <i>LEGIONELLA</i> -INHIBITOREN AUS <i>B. PUMILUS</i> ..	114
5.4	EINSATZ VON GENTAMICIN-BELADENEN LIPOSOMEN ZUR BEHANDLUNG	
	INTRAZELLULÄRER <i>LEGIONELLA</i> -INFEKTIONEN.....	132
5.4.1	Qualitätskontrolle und Zytotoxizität von Liposomen.....	132
5.4.2	Aufnahmeverhalten von Liposomen.....	134
5.4.3	Behandlung intrazellulärer Legionella-Infektionen mit Liposomen.....	136
6	DISKUSSION	141
6.1	INFEKTION VON HUMANEN ZELLEN UND ZELL-LINIEN MIT <i>L. PNEUMOPHILA</i>	141
6.1.1	Die Bedeutung von PMNs für die Infektion mit <i>L. pneumophila</i>	144
6.1.2	Die Bedeutung von NETs für Infektionen <i>L. pneumophila</i>	151
6.2	DIE ROLLE VON PI-METABOLISMUS UND AUTOPHAGIE FÜR DIE INFEKTION MIT.....	
	<i>LEGIONELLA</i>	152
6.2.1	Die Bedeutung von RpkA für die Legionella-Infektion.....	152
6.2.2	Die Bedeutung von Atg9 für die Legionella-Infektion.....	158
6.2.3	Die Funktion der Punktmutation R155C in <i>atg9/cdcD</i> während der Legionella-	
	Infektion.....	162
6.3	PEPTIDLACTONE AUS <i>B. PUMILUS</i> WIRKEN BAKTERIZID AUF <i>LEGIONELLA</i> SPP.	164
6.4	EINSATZ VON LIPOSOMEN ZUR BEHANDLUNG INTRAZELLULÄRER <i>LEGIONELLA</i> -	
	INFEKTIONEN	170
7	AUSBLICK	177
8	ANHANG.....	181
8.1	LITERATURVERZEICHNIS	181
8.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	197
8.3	TABELLENVERZEICHNIS	199
8.4	FACS-ANALYSE	200

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ATG9	Autophagy related protein 9
CytD	Cytochalasin D
DAC	Dual asymmetric centrifugation
DAC-LS	DAC-Liposomen
DAG	Diacylglycerol
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERAD	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
EtOAc	Ethylacetat
FCS	Fötales Kälberserum
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FTD	Frontotemporale Demenz
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gm	Gentamicin
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
huS	Humanes Serum
h	Stunde
IBM	Inclusion body myopathy
IBMPFD	Inclusion body myopathy associated with paget disease of bone and frontotemporal dementia
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
LCV	<i>Legionella</i> containing vacuole
L-Gln	L-Glutamin
MeOH	Methanol
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minuten
MNC	Mononukleare Zellen
MOI	Multiplicity of infection
MPO	Myeloperoxidase

MΦ	aus humanem peripherem Blut isolierte MNC, zu Makrophagen differenziert
NET	Neutrophil extracellular traps
n.i.	Nicht infiziert
OD	Optische Dichte
OMV	Außenmembranvesikel
PDB	Padget disease of bone
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PI	Phosphatidylinositol
p.i.	Post infection
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMN	Polymorphkernige Leukozyten
ppGpp	Guanosin-3',5'-bispyrophosphat
qRT-PCR	Quantitative Real Time-PCR
REV	Reverse phase evaporation
REV-LS	REV-Liposomen
rER	Raues Endoplasmatisches Reticulum
RIN	RNA integrity number
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RpKA	Rezeptor Phosphatidylinositolkinase A
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
ü.N.	Über Nacht
UAc	Uranylacetat
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin Proteasome System
VCP	Valosin containing protein

1 Zusammenfassung / Summary

1.1 Zusammenfassung

Legionella pneumophila ist laut CAPNETZ-Studie jährlich für das Auftreten von ca. 15.000-20.000 Pneumonien in Deutschland verantwortlich. Im natürlichen Lebensraum vermehren sich Legionellen in verschiedenen Protozoa. Über Aerosole können Legionellen auch in die menschliche Lunge gelangen, wo sie sich hauptsächlich in den alveolaren Makrophagen vermehren. Trotz vorhandener Therapiemöglichkeiten über membrangängige Antibiotika liegt die Letalität bei 7-10 %. Themenschwerpunkte der vorliegenden Arbeit waren die Interaktion von Legionellen mit humanen Wirtszellen sowie die Charakterisierung einzelner Wirtszellfaktoren anhand des Modellsystems *D. discoideum*. Auf der Suche nach neuen Therapiestrategien wurden anti-*Legionella* Wirkstoffe aus *Bacillus pumilus* isoliert und der Einsatz von Liposomen als Wirkstoffträgersystem zur Behandlung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen untersucht. Um die Interaktion zwischen Legionellen und polymorphkernigen Leukozyten (PMN) besser zu verstehen, wurde ein Protokoll zur Isolation und Infektion von PMNs mit *L. pneumophila* Corby etabliert. Im Gegensatz zur Infektion von Epithelzellen oder Makrophagen war die vorherige Opsonisierung der Bakterien mit 1 % *L. pneumophila* Antikörper essentiell für die Aufnahme in PMNs. Detaillierte Infektionsassays über 4 h zeigten, dass während der ersten 35 min nach Infektion ein schneller Abbau der Bakterien stattfand. Dieser stagnierte 60 min p.i., wohingegen avirulente *E. coli* vollständig degradiert wurden. Um die molekularen Abläufe aufzuklären, die zur Ausbildung des inaktivierten Phänotyps bei PMNs führen, wurden qRT-PCR Studien durchgeführt. Der Vergleich zwischen nicht infizierten und mit *L. pneumophila* Corby infizierten PMNs deutete auf eine erhöhte Expression des Valosin containing proteins (VCP) zum Zeitpunkt 20 min p.i. in infizierten PMNs hin. Ein bemerkenswertes Ergebnis war außerdem die Beobachtung, dass *L. pneumophila* Corby weder die Bildung von extrazellulären Fallen („neutrophil extracellular traps“, NETs) induziert, noch in der Lage ist bereits vorhandene NETs zu degradieren. Deletionen in Genen des Phosphatidylinositol- (*rpkA*)

und des Autophagy-Metabolismus (*atg9*⁻; *atg9/cdcD*⁻) von *D. discoideum* beeinflussten die Infektion mit *Legionella*. Die Deletion von *rpkA* resultierte in einer besseren Vermehrung von *L. pneumophila* JR32 zu späten Infektionszeitpunkten sowie einem verzögertem Abbau avirulenter Legionellen. *Atg9*⁻ sowie die Doppelmutante *atg9/cdcD*⁻ zeigten eine verminderte Aufnahme von *L. pneumophila* Corby. Darüber hinaus wirkte die Überexpression von *atg9* protektiv auf die Wirtszelle und unterdrückte die bakterielle Vermehrung. Aus *B. pumilus* wurden Pumilacidin A, C, E sowie ein neues Peptidlacton WF und das neue Glycerolipid 1-pentadecanoyl—3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranosyl]-glycerol isoliert. Konzentrationen von 2-6 μ M der Peptidlactone wirkten bakterizid auf *Legionella* spp. sowie *Streptococcus pneumoniae*. TEM-Aufnahmen und SYTOX-green Assays mit *L. pneumophila* deuteten auf eine Membranaktivität der Peptidlactone hin. Eine Alternative gegenüber der konventionellen Antibiotikatherapie stellt die Verkapselung von Antibiotika in Wirkstoffträgern wie Liposomen dar. Der Einsatz von Gentamicin-beladenen DAC-Liposomen (Rodos BioTarget GmbH), die über das „dual asymmetric centrifugation“-Verfahren hergestellt wurden, konnte die Replikation von *L. pneumophila* in Makrophagen erfolgreich reduzieren.

1.2 Summary

Legionella pneumophila is the causative agent of a severe form of pneumonia known as Legionnaires' disease. The CAPNETZ-study estimates that *L. pneumophila* is responsible for 15,000-20,000 cases of pneumonia per year in Germany. In their natural habitat, *Legionellae* replicate within various freshwater protozoa. Through inhalation of *Legionella*-containing aerosols, the bacteria can be taken up into the human lung and replicate mainly inside alveolar macrophages. Despite the availability of membrane permeable antibiotics, the lethality is about 7-10 %. The main topics of this work deal with the interaction of *L. pneumophila* and human host cells, and with the characterization of single host cell factors using the model system *Dictyostelium discoideum*. Searching for new strategies to combat Legionnaires' disease, metabolites toxic to *Legionella* were isolated from *Bacillus pumilus*. Furthermore, the use of liposomes as drug carriers to treat intracellular *Legionella*-infections was investigated. In order to analyze the interaction between *L. pneumophila* and polymorphonuclear leukocytes (PMNs), a protocol for the isolation and infection of PMNs with *L. pneumophila* was established. For efficient uptake by PMNs, the bacterial opsonisation with 1 % *L. pneumophila* antibody was found to be an indispensable precondition. This is not the case when lung epithelial cells or macrophages were infected with *L. pneumophila*. Whereas epithelial cells and macrophages are host cells of *L. pneumophila*, the bacteria were not able to replicate within PMNs. Instead, they were rapidly degraded during the first 35 min p.i. Subsequently, the degradation stagnated at 60 min p.i., whereas avirulent *E. coli* were completely degraded. To investigate the molecular mechanism responsible for the observed inactivated phenotype of PMNs, qRT-PCR was employed. The comparison of non-infected leukocytes to cells infected with *L. pneumophila* Corby indicated a higher relative expression level for the valosin containing protein (VCP) at 20 min p.i., suggesting that *L. pneumophila* interferes with the gene expression of PMNs. Two striking results were the discovery that *L. pneumophila* Corby does not induce the formation of neutrophil extracellular traps (NETs), and it is not able to degrade existing NET-structures. Altered functions in the functions phosphatidylinositol metabolism (*rpKA*⁻) and

autophagy (*atg9*; *atg9/cdcD*) of *D. discoideum* mutants had impact on *Legionella* infection. Compared to wild type cells, the gene deletion of *rpkA* leads to better bacterial replication at late infection stages and a slower degradation of avirulent *Legionella*. With the help of the autophagy mutants, it was shown that autophagy plays an essential role during bacterial uptake. Furthermore, overexpression of *atg9* had a protective effect on the host cell and inhibited *L. pneumophila* replication. Pumilacidin A, C, E, the novel peptide lactone WF and the glycerolipid 1-pentadecanoyl—3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-glycerol were isolated from *B. pumilus*. The peptide lactones showed a narrow inhibitory spectrum, which was restricted to *Legionella* spp. and *Streptococcus pneumoniae*, with concentrations of 2-6 μ M being bactericidal for the tested strains. TEM-images and SYTOX-green assays with *L. pneumophila* indicated that the metabolites were membrane active. A promising alternative to conventional antibiotics is the encapsulation of antibiotics in liposomes as drug carrier system. We demonstrated that gentamicin containing DAC-liposomes (supplied by Rodos BioTarget GmbH) that are synthesized by dual asymmetric centrifugation are taken up by human macrophages and reduce the intracellular replication of *L. pneumophila*.

2 Einleitung

Der Name *Legionella pneumophila* geht zurück auf den ersten großen registrierten Krankheitsausbruch 1976 in Philadelphia (USA). Auf einer Tagung amerikanischer Kriegsveteranen (American Legion Convention) erkrankten 221 von 4400 Teilnehmern an einer schweren atypischen Pneumonie, von denen 34 starben. Der bis dahin unbekannte Erreger konnte erst im darauffolgenden Jahr von Joseph McDade und Kollegen in Meerschweinchen rekultiviert werden und wurde in Anlehnung an den historischen Krankheitsausbruch *Legionella pneumophila* genannt (McDade *et al.*, 1977, Fraser *et al.*, 1977).

2.1 Biologie, Ökologie und Epidemiologie von Legionellen

Legionellen sind Gram-negative, aerobe, unipolar flagellierte Stäbchen mit einer Länge von 2-20 µm und einem Durchmesser von 0,3-0,9 µm (Diederer, 2008). Die Gattung *Legionella* gehört zur Familie der *Legionellaceae* und wird phylogenetisch den γ-Proteobakterien zugeordnet (Brenner *et al.*, 1979). Bisher wurden 54 *Legionella*-Spezies identifiziert und 73 Serogruppen zugeordnet (www.bacterio.cict.fr/; www.dsmz.de). Zu den *Legionellaceae* zählen außerdem 12 sogenannte *Legionella*-like amoebal pathogens (LLAP), die durch Kokultur mit Protozoen aus Patientenmaterial isoliert werden konnten (Adeleke *et al.* 1996, 2001).

Legionellen sind Umweltbakterien, die in aquatischen Habitaten sowie feuchten Böden zu finden sind. Dort kommen sie entweder freilebend, in Biofilmen oder in Assoziation mit Protozoen vor (Fields *et al.*, 1996, Fields *et al.*, 2002, Fliermans *et al.*, 1981, Rowbotham, 1986). Zusätzlich zu den natürlichen Habitaten bieten die vom Menschen geschaffenen Warmwassersysteme wie z.B. Kühltürme, Whirlpools, Sprinkleranlagen, Duschen oder Klimaanlage optimale Vermehrungsbedingungen für Legionellen bei 25 bis 45 °C. Für die Besiedlung der Wassersysteme mit Legionellen spielt die Biofilmbildung eine besonders wichtige Rolle. Unter natürlichen Bedingungen vermehren sich Legionellen nicht frei im Wasser. Als fakultativ intrazelluläre Pathogene sind sie auf Biofilm-assoziierte Protozoen unterschiedlicher Gattungen, wie z.B. *Tetrahymena*, *Acanthamoeba* oder *Hartmannella* angewiesen. Die Biofilme an

sich, sowie die intrazelluläre Vermehrung in Protozoen bieten den Bakterien zusätzlichen Schutz vor extremen Umweltbedingungen wie Desinfektionsmaßnahmen oder hohen Temperaturen (Taylor *et al.*, 2009, Alleron *et al.*, 2008, Kilvington *et al.*, 1990, Declerck 2010). Die Infektion beim Menschen kann letztlich durch Inhalation *Legionella*-haltiger Aerosole aus kontaminierten Wassersystemen erfolgen. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch wurde bisher nicht beobachtet (Fraser *et al.*, 1977). Das Krankheitsbild äußert sich entweder in Form eines selbst-limitierenden, grippeähnlichen Infekts, dem Pontiac-Fieber, oder als schwere atypische *Legionella*-Pneumonie (Legionärskrankheit). Symptome sind häufig hohes Fieber, Husten, Kopfschmerzen, Übelkeit und seltener Diarrhö (Tsai *et al.*, 1979). In Deutschland erkranken jährlich rund 500 Menschen, wobei in Hochrechnungen der CAPNETZ-Pneumoniestudie von einer relativ großen Dunkelziffer mit ca. 15.000-20.000 Infektionen ausgegangen wird (RKI, Epidemiologisches Bulletin Nr. 50, Baum *et al.*, 2008). Für die Mehrzahl der Infektionen (78-84 %) ist *L. pneumophila* Serogruppe 1 verantwortlich. Weitere Spezies, die häufig einen Ausbruch der Krankheit verursachen, sind *L. longbeachae*, *L. bozemanii* oder *L. micdadei* (Yu *et al.*, 2002, Brodhun & Buchholz, 2011). Unbehandelt verläuft die Krankheit in 10-15 % der Fälle tödlich. Aufgrund der intrazellulären Lebensweise der Bakterien ist die Behandlung mit membrangängigen Antibiotika nötig. Hierzu zählen die Makrolide Erythromycin, Clarithromycin, Azithromycin, Roxithromycin sowie die Fluorochinolone Levofloxacin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Gemifloxacin (Stout & Yu, 1997, Mandell *et al.*, 2003, Yu *et al.*, 2004, Haranaga *et al.*, 2006, Blazquez-Garrido *et al.*, 2005).

2.2 Das menschliche Immunsystem

Die Funktion unseres Immunsystems besteht darin, eingedrungene Fremdkörper wie z.B. pathogene Mikroorganismen oder Krebszellen zu erkennen und abzubauen. Hierbei spielen die angeborene sowie die adaptive Immunantwort eine wichtige Rolle. Das angeborene Immunsystem besitzt eine wichtige Funktion in der frühen Abwehr bakterieller Infektionen. Zu den Hauptbestandteilen gehören physikalische äußere Schutzbarrieren, wie z.B. die Haut und Schleimhäute aber auch das Flimmerepithel der Lunge. Die Haut und

die inneren Zellen der Lungenoberfläche sezernieren eine Reihe antimikrobieller Peptide (β -Defensine). Diese zerstören Bakterienzellwände und erschweren das Eindringen der Pathogene in das Lungengewebe.

Daneben gibt es eine Vielzahl an Abwehrzellen, die Fremdkörper erkennen können und in der Lage sind diese abzubauen sowie weitere Immunreaktionen zu stimulieren. Zu diesen phagozytierenden Zellen gehören Makrophagen, Blutmonozyten, polymorphkernige Leukozyten (PMNs), dendritische Zellen (DCs) und natürliche Killerzellen (NKs). Phagozyten exprimieren verschiedene Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (PRRs, pathogen recognition receptors) und erkennen damit pathogene Mikroorganismen. Hierzu zählen unter anderem die Toll-like Rezeptoren (TLRs) und Lektin-Rezeptoren. Sie sind in der Lage, bestimmte Strukturen von Mikroorganismen zu binden und durch Signalkaskaden eine Immunreaktion des Wirtes auszulösen. Zu den bakteriellen Strukturen, den sogenannten pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), die von diesen Rezeptoren erkannt werden, gehören bakterielles Peptidoglykan, Lipopolysaccharid (LPS) und bakterielle DNA. Es folgt eine Ausschüttung von Botenstoffen wie Zytokinen, die weitere Immunzellen anlocken bzw. deren Differenzierung und Aktivierung auslösen.

Ein weiterer wichtiger Verteidigungsmechanismus der angeborenen Immunantwort ist das Komplementsystem. Es handelt sich hierbei um lösliche Plasmaproteine, die in der Lage sind, bestimmte Strukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen zu binden. Diese Form der Markierung wird auch als Opsonisierung bezeichnet und ermöglicht Phagozyten auch Pathogene zu zerstören, die sie sonst nicht erkennen würden. Die Opsonisierung durch Komplementfaktoren muss jedoch keine Phagozytose zur Folge haben. Alternativ kann die Bildung des Membranangriffskomplexes an der bakteriellen Zellmembran induziert werden (Porenbildung in der Zellmembran) und letztlich die Zellyse herbeiführen.

Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort wird die adaptive Immunantwort erst nach Kontakt mit den Erregern aktiviert und daher als sekundäre Immunantwort bezeichnet. In den peripheren lymphatischen Organen erfolgt die Ausbildung von B- und T-Zellen, die für die humorale bzw. zellvermittelte Immunantwort wichtig sind. B-Lymphozyten produzieren Antikörper, die extrazelluläre Antigene erkennen und binden. T-Lymphozyten erkennen

spezifische Antigene, die über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) auf Zellen präsentiert werden. Deshalb sind T-Lymphozyten in der Lage auch Zellen zu erkennen, die intrazelluläre Erreger enthalten und vor der Markierung durch Antikörper geschützt sind. Eine weitere wichtige Eigenschaft der adaptiven Immunantwort ist die Ausbildung sogenannter T- und B-Gedächtniszellen. Bei erneuter Infektion mit demselben Erreger wird eine schnellere Immunreaktion ausgelöst. Folglich bricht die Erkrankung nicht aus oder verläuft wesentlich schwächer (Rink *et al.*, 2012, Zündorf *et al.*, 2007).

2.2.1 Interaktion von *Legionella* mit dem Wirts-Immunsystem

Legionellen sind als fakultativ intrazelluläre Pathogene in der Lage ein breites Spektrum an Protozoen zu infizieren. Es wird angenommen, dass diese Co-Evolution eine zentrale Rolle für die Etablierung der *Legionella*-Infektion im Menschen spielt. Über Aerosole können die Bakterien in die Lunge gelangen, wo sie sich bevorzugt in den alveolaren Makrophagen sowie den peripheren Blutmonozyten vermehren. Legionellen können jedoch auch polymorphkernige Leukozyten sowie dendritische Zellen infizieren und sich in Typ I- und Typ II-Lungenepithelzellen vermehren (Horwitz & Silverstein, 1980, Alli *et al.*, 2000, Murata *et al.*, 1998, Dowling *et al.*, 1999). Die Mehrzahl der Menschen, die Legionellen ausgesetzt sind, werden jedoch nicht infiziert oder zeigen in Folge einer selbst-limitierenden Infektion einen milden Krankheitsverlauf. Eine effiziente Immunantwort kann somit die Etablierung einer *Legionella*-Infektion verhindern. Dies zeigte sich auch beim Krankheitsausbruch 1976 in Philadelphia. Hier wurden bei einem Großteil des Hotelpersonals Antikörper gegen *Legionella* im Serum nachgewiesen. Die Personen waren jedoch nicht an Legionellose erkrankt.

Das angeborene Immunsystem spielt in der Bekämpfung von *Legionella* eine entscheidende Rolle (Palusinska-Szys & Janczarek, 2010). Ist das Immunsystem geschwächt, kann sich eine *Legionella*-Infektion etablieren und zur Ausbildung einer schweren atypischen Pneumonie, der Legionärskrankheit führen. Zu den Risikogruppen zählen Menschen mit Lungenerkrankungen, Raucher, Alkoholiker, Krebspatienten sowie ältere Menschen (Breiman & Butler, 1998, Marston *et al.*, 1994). Über Aerosole aufgenommene Bakterien

treffen zunächst auf das Flimmerepithel der Lunge. Hier werden die meisten Fremdpartikel und Mikroorganismen über sogenannte mukoziliäre „clearance“ aus der Lunge entfernt. Bakterien, die nicht über das Flimmerepithel entfernt werden, treffen auf eine Barriere aus Epithelzellen. Diese, sowie auf der Innenseite der Alveoli sitzende Makrophagen, sind in der Lage pro-inflammatorische Zytokine auszuschütten sowie antimikrobielle Peptide zu produzieren (McCormack *et al.*, 2002). Scharf *et al.* zeigten, dass *L. pneumophila* die verstärkte Produktion von β -Defensin-3 in Lungenepithelzellen und Makrophagen auslöst, und dass rekombinantes β -Defensin-3 antimikrobiell auf Legionellen wirkt (Scharf *et al.*, 2010). Die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 oder TNF- α) führt zur Anlockung weiterer Immunzellen und deren Einwanderung ins Gewebe. In Bezug auf *Legionella* konnte mehrfach gezeigt werden, dass durch die Aktivierung von Makrophagen und peripheren Blutmonozyten mit INF- γ oder TNF- α eine Vermehrung von Legionellen unterdrückt wird (Bhardwaj *et al.*, 1986, Nash *et al.*, 1988). TNF- α ist ein Zytokin, das die bakterizide Aktivität von Makrophagen erhöht und einen massiven „oxidativen burst“ auslösen kann. Im Gegensatz dazu ist IL-10 ein inhibierendes Zytokin, das zu einer verstärkten Replikation von Legionellen führt und den positiven Effekt von INF- γ aufhebt (Nash *et al.*, 1984). Das Gleichgewicht zwischen INF- γ und IL-10 ist sehr wahrscheinlich entscheidend dafür, ob Makrophagen und Monozyten die Vermehrung von *Legionella* zulassen oder verhindern (Park & Skerrett, 1996).

2.2.2 Interaktion von *Legionella* mit polymorphkernigen Leukozyten

PMNs gehören wie Makrophagen zu den Phagozyten der angeborenen Immunabwehr. Trotz ihrer gemeinsamen Aufgabe, Pathogene sowie apoptotische Zellen abzubauen, weisen sie grundlegende Unterschiede auf. Im Gegensatz zu Makrophagen besitzen PMNs eine kurze Lebensdauer von einigen Stunden und werden täglich in großen Mengen neu im Knochenmark gebildet. Charakteristisch ist nicht nur ihr mehrfach gelappter Zellkern sondern auch ihre geringe RNA- sowie Proteinbiosyntheseaktivität. Nach erfolgter Aufnahme von Mikroorganismen fusionieren die Phagosomen mit

intrazellulären Granula und bauen die Bakterien durch sauerstoffunabhängige und sauerstoffabhängige Mechanismen ab. Bei den sauerstoffunabhängigen Prozessen spielen antimikrobielle Peptide und Enzyme wie z.B. Cathelicidine, Defensine, Elastase oder auch Myeloperoxidase (MPO) eine Rolle. Diese sind in den Granula gespeichert und in der Lage Pathogene sowie einige ihrer Virulenzfaktoren zu degradieren. Der sauerstoffabhängige „oxidative burst“ beinhaltet die Produktion radikaler Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) durch den NADPH-Oxidase-Komplex, der sich auf der phagosomalen Membran anlagert (Segal, 2005). Im Anschluss an den Abbau des Phagosomeninhalts wird Apoptose in den PMNs induziert. Makrophagen sind wiederum in der Lage apoptotische Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Dadurch wird die Freisetzung der vielen, auch für die Wirtszellen schädlichen, Granula-Enzyme verhindert und die Inflammation im Gewebe reduziert (Silva 2010).

Viele Mikroorganismen haben Mechanismen entwickelt, um dem Abbau durch Makrophagen zu entgehen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die wenigsten Mikroorganismen in der Lage sind dem Abbau durch PMNs zu entgehen. *Anaplasma phagocytophila* und *Chlamydia trachomatis* sind bisher die einzigen bekannten Bakterien, die sich in PMNs vermehren können (Allen, 2003, van Zandbergen *et al.*, 2004). *Chlamydia* fördert die Aufnahme von apoptotischen PMNs durch Makrophagen. Im Gegensatz zur direkten Phagozytose der Bakterien durch Makrophagen findet hier eine „stille Aufnahme“ statt. Durch sogenannte „eat-me“-Signale apoptotischer PMNs werden keine antimikrobiellen Abbaumechanismen in den Makrophagen eingeleitet. Den Bakterien bleibt somit mehr Zeit, ihre replikative Nische in den Makrophagen zu etablieren (Rupp *et al.*, 2009).

Die Interaktion von Legionellen mit Makrophagen oder Protozoen ist in den letzten Jahrzehnten ausgiebig untersucht worden. Welche Rolle PMNs während einer *Legionella*-Infektion spielen, ist hingegen weniger gut erforscht. Obwohl PMNs, wie die Makrophagen und Protozoen zu den professionell phagozytierenden Zellen gehören, weisen sie in Bezug auf die Aufnahme sowie Prozessierung des *Legionella*-haltigen Phagosoms erhebliche Unterschiede

auf. So erfolgt die Phagozytose in Makrophagen unabhängig von Opsoninen. Zur Aufnahme von *L. micdadei* und *L. pneumophila* in PMNs ist die Opsonisierung mit Serum bzw. Immuns serum jedoch essentiell (Horwitz & Silverstein, 1981, Donowitz *et al.*, 1990, Verbrugh *et al.*, 1984). Weiterhin wurde gezeigt, dass keine Assoziation der LCV mit dem ER erfolgt. Stattdessen fusionieren intrazelluläre Granula mit der LCV und es kommt zur Induktion eines massiven „oxidativen bursts“, gefolgt von der Degradation der Bakterien (Gagnon *et al.*, 2002). Hierfür ist sehr wahrscheinlich die schnelle Produktion von ROS, im Besonderen durch die MPO, verantwortlich. In einem zellfreien System wurde gezeigt, dass Legionellen effektiv durch ROS abgetötet werden (Jepras & Fitzgeorge, 1986). Ungefähr 30 min nach Infektion weisen PMNs jedoch einen inaktivierten Phänotyp auf und es erfolgt kein weiterer Abbau der Legionellen. Inaktivierte PMNs zeichnen sich durch verminderte Chemotaxis in Reaktion auf Stimuli wie z.B. das chemotaktische Peptid N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) aus. Durch Legionellen inaktivierte PMNs zeigen außerdem eine verminderte bakterizide Wirkung auf nachfolgend phagozytierte *E. coli* oder *S. aureus* (Donowitz *et al.*, 1990). Dies zeigt, dass Legionellen aktiv in die Signalkaskaden der PMNs eingreifen. Wie *Legionella* mit den PMNs interagiert, ist bisher nicht bekannt und stellt ein spannendes Forschungsgebiet dar. *In vitro* Experimente mit Meerschweinchen zeigten, dass 24 h nach Infektion eine starke Vermehrung der Legionellen und zeitgleich ein verstärkter Influx von Neutrophilen in die Lunge stattfindet. Lebende Legionellen befanden sich überwiegend in den alveolaren Makrophagen, tote Bakterien hingegen in den PMNs (Dowling *et al.*, 1992). Dies sowie die Tatsache, dass A/J-Mäuse, bei denen die Rekrutierung von PMNs verhindert wurde, eine höhere Mortalität aufwiesen, zeigt die Bedeutung von PMNs für den Infektionsverlauf (Tateda *et al.*, 2001).

2.2.3 Neutrophile extrazelluläre Fallen

PMNs spielen nicht nur als phagozytierende Zellen zum Abbau von Mikroorganismen eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem. PMNs, Mastzellen und Eosinophile sind zusätzlich in der Lage, die Ausbreitung von Pathogenen im Gewebe durch die Produktion sogenannter extrazellulärer

Fallen (NETs, neutrophil extracellular traps) zu verhindern (Yousefi *et al.*, 2008, Köckritz-Blickwede, 2010). NETs bestehen aus der DNA der jeweiligen Zelle, welche sich mit Proteinen und Enzymen der Granula vermischt und netzartige Strukturen im extrazellulären Raum ausbildet. Dies verhindert lokal die Ausbreitung von Pathogenen, welche in den Netzstrukturen hängen bleiben (Fuchs *et al.*, 2007, Köckritz-Blickwede *et al.*, 2009). McDonald *et al.* 2012 zeigten, dass NETs auch als inflammatorische Antwort während Sepsis entscheidend dazu beitragen, die Ausbreitung von Bakterien im Blutstrom zu reduzieren. Die meisten Bakterien, die sich in den NET-Strukturen verfangen, werden von den hohen lokalen Konzentrationen an mikrobiziden Enzymen und antimikrobiellen Peptiden getötet. NETs sind allerdings auch in der Lage von Bakterien sezernierte Virulenzfaktoren zu degradieren und können diese sozusagen „entwaffnen“ (Weinrauch *et al.*, 2002).

Wann und wie NETs *in vivo* induziert werden, ist noch nicht abschließend geklärt. Der Prozess ist abhängig von der Induktion einer ROS-vermittelten Signalkaskade und wird u.a. durch Zytokine, pathogene Mikroorganismen oder LPS stimuliert. *In vitro* wurde gezeigt, dass die Bildung von NETs u.a. durch die Zugabe von IL-8, PMA oder LPS ausgelöst werden kann (Brinkmann *et al.*, 2004, Martinelli *et al.*, 2004, Fuchs *et al.*, 2007). Zunächst erfolgt die globale Kondensation von Chromatin und die gelappte Kernstruktur der PMNs geht verloren. Es folgt die Auflösung der Kernmembran und der Membran der zytoplasmatischen Granula. Noch in der Zelle findet die Vermischung von Zellkern-DNA mit den Granulaenzymen (MPO, Elastase) und antimikrobiellen Peptiden (Cathelicidine) statt. Dieses Gemisch wird anschließend von den Zellen freigesetzt (Brinkmann *et al.*, 2004). Erst mit Freisetzung der NETs sterben die Zellen (s. Abbildung 2.1). Um diesen Zelltod von Apoptose und Nekrose abzugrenzen, wurde er als ETosis bezeichnet (Wartha & Henriques-Normark, 2008). Bei ETosis kann, im Gegensatz zur Apoptose, kein Phosphatidylserin an der Zellmembran detektiert werden und die DNA wird nicht degradiert. Im Unterschied zu Nekrose führt ETosis zur Auflösung der Zellkernmembran (Fuchs *et al.*, 2007).

Das Grundgerüst von NETs besteht aus DNA. DNasen sind in der Lage die NETs zu zerstören und damit die bakterizide Wirkung aufzuheben (Brinkmann

et al., 2004). Einige Mikroorganismen, wie z.B. *S. pneumoniae* produzieren Nukleasen und können NET-Strukturen abbauen (Buchanan *et al.*, 2006; Wartha *et al.*, 2007). Dadurch sind sie weniger stark der bakteriziden Wirkung von NETs ausgesetzt. So war eine Mutante von *S. pneumoniae*, bei der eine Deletion der DNase EndA vorlag, weiterhin in der Lage den oberen respiratorischen Trakts bei Mäusen zu infizieren. Die Mutante konnte sich jedoch nicht im Blutstrom ausbreiten und war hierdurch weniger virulent (Beiter *et al.*, 2006). Dies deutet darauf hin, dass NETs eine wichtige Rolle zur Eindämmung von Infektionen spielen. Ob *Legionella*, wie viele andere Gram-negative Bakterien ebenfalls zur Ausbildung von NETs führen, ist bisher nicht bekannt.

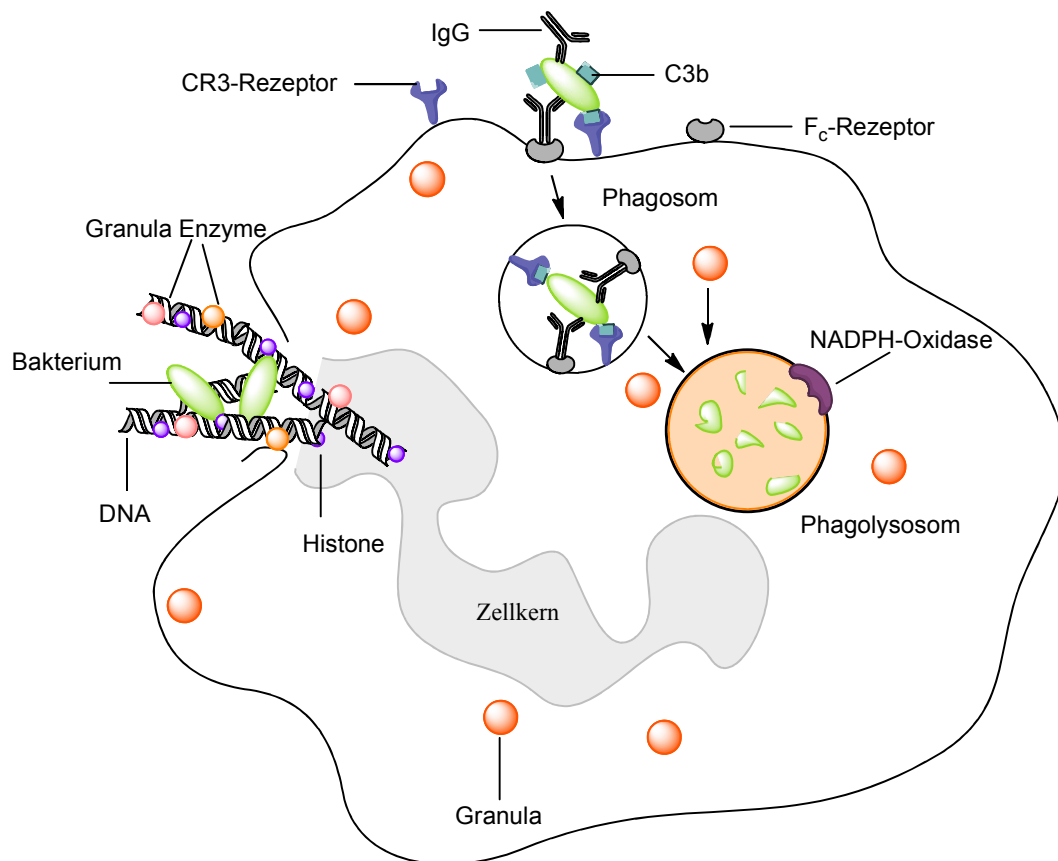


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung von Phagozytose und ETosis zum Abbau von Mikroorganismen durch PMNs. Durch Antikörper oder Komplementfaktoren wie C3b markierte Mikroorganismen werden an entsprechende Rezeptoren auf der PMN-Oberfläche gebunden und anschließend phagozytiert. Die Fusion des Phagosoms mit Granula (Granulaenzyme) sowie die Anlagerung der NADPH-Oxidase (ROS-Produktion) führen zum Abbau der Mikroorganismen. Alternativ kann ETosis induziert werden. Hierbei werden die Zellkernmembran sowie die intrazellulären Granula langsam aufgelöst. Es kommt zur Vermischung von Kern-DNA mit dem Granulainhalt im Zytoplasma der Zelle und der anschließenden Freisetzung des DNA-Protein-Gemisches. Die netzartigen Strukturen, bestehend aus einem DNA-Rückgrat, vermischt mit Histonen, Granulaenzymen und -peptiden, sind toxisch für viele Bakterien, die in den NETs hängen bleiben (modifiziert nach Hickey & Kubes, 2009).

2.2.4 Virulenzfaktoren und intrazellulärer Lebenszyklus von *Legionella*

Legionellen verfügen über eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, die eine wichtige Rolle in der extrazellulären Pathogenität sowie bei der Etablierung einer replikativen Nische in der Wirtszelle spielen. Hierzu zählen die Sekretionssysteme der Typen I, II, IV und V sowie LPS, Flagellen, Außenmembranvesikel (OMV, outer membrane vesicles) und Pili (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007, Newton, 2010). Hauptvirulenzfaktoren sind das Typ IVB- (dot/icm, defect in organelle trafficking/intracellular multiplication) und das Typ II-Sekretionssystem Lsp (Lsp, Legionella secretion pathway). Sie tragen während einer Infektion entscheidend dazu bei, die Fusion des *Legionella*-haltigen Phagosoms mit Lysosomen zu verhindern, die Nährstoffzufuhr zu sichern und den frühzeitigen Wirtszelltod zu verhindern. Für die extrazelluläre Pathogenität der Legionellen spielt das Typ II-Sekretionssystem (Typ II SS) eine wichtige Rolle. Sezernierte Proteasen, Phosphatasen, Lipasen und weitere Enzyme sind an der Degradation des Lungensurfaktants sowie der extrazellulären Matrix beteiligt und tragen entscheidend zur Zerstörung der Alveoli bei.

Adhäsion und Phagozytose

Die Infektion beginnt mit der Aufnahme der Legionellen in die Wirtszelle. Ein besonderer Aufnahmemechanismus ist die sogenannte „coiling“ Phagozytose, die bei Makrophagen sowie Protozoen beobachtet wird. Das Pseudopodium wickelt sich hierbei mehrfach um das Bakterium, welches anschließend vom Phagozyten internalisiert wird und sich in einer Bakterien-haltigen Vakuole, dem Phagosom befindet (Horwitz, 1984, Rechnitzer & Blom 1989, Bozue & Johnson, 1996). Neben der „coiling“ Phagozytose erfolgt die Aufnahme in Makrophagen oder Monozyten Rezeptor-abhängig über die Bindung der Komplementfaktoren C3b und iC3b an das „major outer membrane protein“ (MOMP) von *Legionella*. Der Komplex aus MOMP-C3b/iC3b bindet anschließend an die Komplementrezeptoren CR1 und CR3, die sich auf der Oberfläche von phagozytierenden Zellen befinden (Payne & Horwitz, 1987, Bellinger-Kawahara & Horwitz, 1990). Zuvor mit Antikörpern opsonisierte Legionellen werden über die Bindung an Fc-Rezeptoren und anschließender Phagozytose internalisiert

(Husmann & Johnson, 1992). Außerdem kann die Aufnahme von *Legionella* auch ohne vorherige Opsonisierung mit Komplement oder Antikörpern über die Bindung an Kohlenhydrat- oder Lipidstrukturen auf der Bakterienoberfläche erfolgen (Rodgers & Gibson, 1993, Gibson *et al.*, 1994, Tachado *et al.*, 2008). Typ IV Pili sind ebenfalls an der Aufnahme in Protozoen, U937-Makrophagen sowie HeLa-Zellen beteiligt (Stone & Abu Kwaik, 1998) und das Protein Hsp60 ist für die Aufnahme in Epithelzellen von Bedeutung (Garduño & Hoffman, 1998).

Intrazelluläre Vermehrung

Nach erfolgter Phagozytose befinden sich die Legionellen im Phagosom. Mit Hilfe zahlreicher Virulenzfaktoren manipulieren sie den endolysosomal Reifungsprozess des Phagosoms und sind letztendlich in der Lage eine replikative Nische zu etablieren. Hierzu nutzt *L. pneumophila* hauptsächlich das Typ IVB-Sekretionssystem (Typ IVB SS) und kann über 300 Effektorproteine in die Wirtszelle injizieren (Hubber & Roy, 2010, Viner *et al.*, 2012). Zu frühen Infektionszeitpunkten verhindern diese u.a. eine Fusion mit Lysosomen und die Ansäuerung des *Legionella*-haltigen Phagosoms (Horwitz, 1983a & b, Horwitz & Maxfield, 1984). Die LCV ist charakterisiert durch das Fehlen von typischen endosomalen Markern wie LAMP-1, LAMP-2 und Rab 7 sowie dem lysosomalen Marker Cathepsin D (Sturgill-Koszycki & Swanson, 2000, Swanson & Hammer, 2000). Seeger *et al.* zeigten außerdem, dass bereits das Vorhandensein von *Legionella*-LPS und OMV genügt, um die Phagolysosomenfusion zu verhindern. Für die erfolgreiche Etablierung der Infektion ist das Typ IVB SS jedoch essentiell (Joshi *et al.*, 2001, Seeger *et al.*, 2010). Die Mutation von *dotA*, einer zentralen Untereinheit des Typ IVB SS, führt zur Degradation der Legionellen in Protozoen und verhindert ebenso deren Replikation in humanen Zellen. Abbildung 2.2 zeigt die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen.

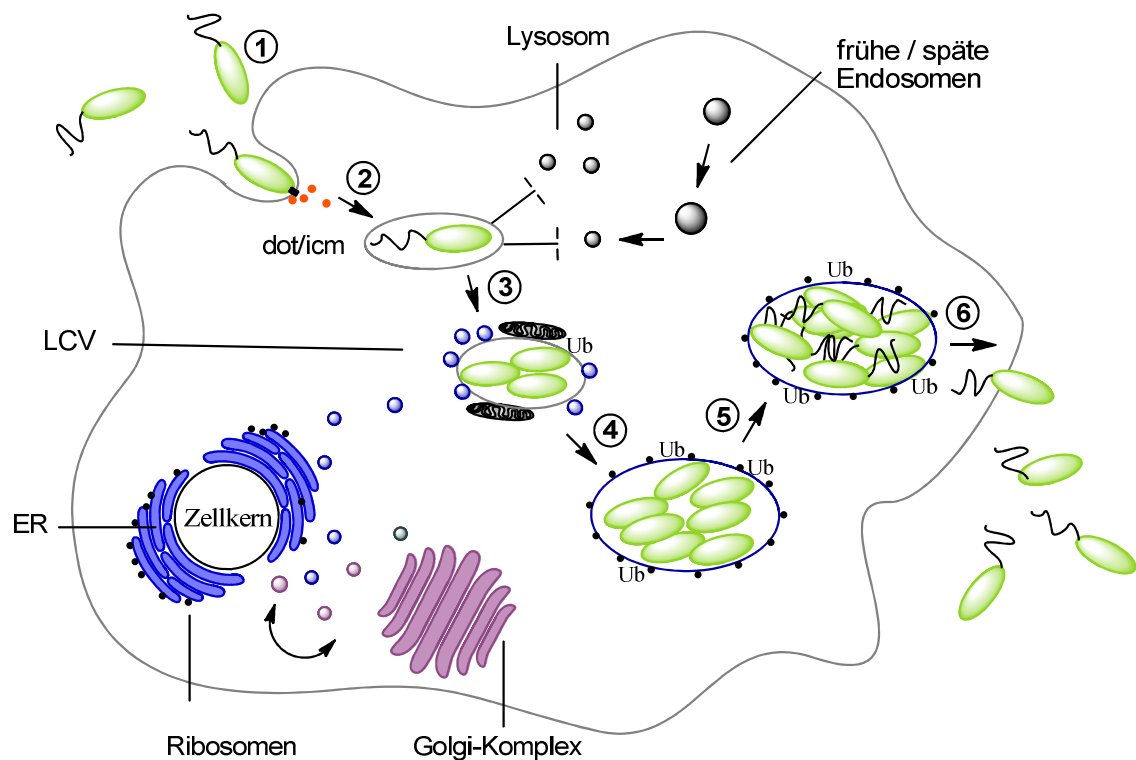


Abbildung 2.2: Intrazellulärer Infektionszyklus von *Legionella*. 1: Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle. 2: *Legionella*-Effektoren des Typ IVB SS (*dot/icm*) inhibieren die Fusion des Phagosoms mit Lysosomen bzw. späten Endosomen. 3: Sekretorische Vesikel des ER fusionieren mit der LCV und Mitochondrien sowie Ubiquitin (Ub) lagern sich an. 4: Legionellen vermehren sich in einer mit Ribosomen besetzten LCV. 5: Nach erfolgter Replikation werden die Legionellen erneut motil. 6: Austritt aus der Wirtszelle (modifiziert nach Hubber & Roy, 2010).

Bisher wurden ca. 300 Effektorproteine identifiziert (Hubber & Roy, 2010, Viner *et al.*, 2012). Aufgrund der hohen Redundanz konnten jedoch nur von einem kleinen Teil die Funktion und die Interaktionspartner auf der Wirtszellseite aufgeklärt werden. Aber bereits die im Vergleich wenigen, untersuchten Effektoren zeigen, auf welch raffinierte Weise *L. pneumophila* den Vesikeltransport seines Wirtes manipulieren kann. Bereits kurz nach der Aufnahme rekrutiert die LCV Mitochondrien und Vesikel des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Swanson & Isberg, 1995, Abu Kwaik, 1996). An diesem Prozess sind kleine GTPasen wie Rab1, Sar1 und Arf1 beteiligt, die durch Effektoren des Typ IVB SS an die LCV angelagert werden (Kagan & Roy, 2002, Derre & Isberg, 2004, Kagan *et al.*, 2004). Rab1 wird über den *Legionella*-Effektor SidM/DrrA, einem Guanin nucleotide exchange factor (GEF), an die LCV rekrutiert. Die Aktivierung und Deaktivierung dieser kleinen GTPase wird strikt durch die Effektoren LidA und LepB reguliert. Rab1 sowie

Sar1 sind essentiell für die intrazelluläre Vermehrung. Fehlen die beiden GTPasen, kommt es zu einer reduzierten Replikation der Legionellen (Kagan *et al.*, 2004, Derre & Isberg, 2005, Machner & Isberg, 2006, Ingmundson *et al.*, 2007, Neunuebel *et al.*, 2012). SidJ ist ebenfalls an der Vesikelrekrutierung beteiligt und essentiell für die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella* in Makrophagen sowie *D. discoideum* (Liu & Luo, 2007). Es wird angenommen, dass Legionellen die Transportmechanismen des ER nutzen, um Effektorproteine zu modifizieren und an ihren Zielort zu bringen (Roy, 2002). Mit der weiteren Ausdifferenzierung des Phagosoms verschmelzen die ER-Vesikel mit der LCV. Es folgt die Anlagerung von Ribosomen und die Vermehrung der Legionellen setzt ein. Das Vorhandensein von ER-Markern wie die Protein-disulfid-Isomerase oder Glukose-6-Phosphatase sind ein Indiz dafür, dass die ER-Membran für die Bildung der LCV verwendet wird. Die mit Ribosomen besetzte LCV weist starke Ähnlichkeiten zum rauen ER (rER) auf (Horwitz, 1983b, Swanson & Isberg, 1995, Tilney *et al.*, 2001, Robinson *et al.*, 2006). In dieser Phase sind die Legionellen nicht flagelliert, salzresistent, pH-resistent und weisen eine reduzierte Expression von Virulenzgenen auf (Swanson & Hammer, 2000, Brüggemann *et al.*, 2006). In der späten Phase der Replikation fusioniert die LCV mit Lysosomen, wodurch sehr wahrscheinlich weitere Nährstoffe für die bakterielle Vermehrung zur Verfügung gestellt werden (Sturgill-Koszycki & Swanson, 2000). Setzt Nährstoffmangel ein, wird das Alarmon Guanosin-3',5'-bispyrophosphat (ppGpp) verstärkt synthetisiert und leitet die transmissive Phase der Infektion ein. Diese zeichnet sich durch eine verringerte Replikationsrate, verstärkte Salz-Sensitivität, osmotische Stressresistenz, Motilität sowie die Expression von Virulenzgenen aus, die die Phagolysosomen-Reifung im nächsten Wirt verhindern (Rowbotham, 1986, Byrne & Swanson, 1998, Brüggemann *et al.*, 2006). Schließlich kommt es zur Lyse der Wirtszelle und Freisetzung der Legionellen. An diesem Prozess scheint ein bisher nicht identifiziertes, porenbildendes Toxin sowie die zunehmende Motilität der Bakterien beteiligt zu sein (Byrne & Swanson, 1998, Alli *et al.*, 2000). In Bezug auf die Bildung der LCV ist anzumerken, dass neuere Studien eine große Ähnlichkeit der LCV zu Autophagosomen zeigen konnten. In beiden Fällen erfolgen die Rekrutierung von ER, Ubiquitin und die Anlagerung

des Markers LC3 (Deretic, 2006). Inwiefern Autophagie eine Rolle für die Infektion mit Legionellen spielt, wird in Abschnitt 2.3.2 näher erläutert.

Interaktion von *Legionella* mit der Wirtszell-Apoptose

Ein weiterer Faktor für die erfolgreiche Etablierung der Infektion ist die Verzögerung der Wirtszell-Apoptose, weil ein frühzeitiges Absterben des Wirtes den Bakterien ihre Nahrungs- und Vermehrungsgrundlage entziehen würde. So wird die Etablierung einer *Legionella*-Infektion in Mäusen durch eine robuste Induktion von Apoptose verhindert. Die Aktivierung von Caspasen spielt hierbei eine zentrale Rolle. Nod-ähnliche Rezeptoren, die sich im Zytoplasma der Wirtszelle befinden, erkennen und binden Strukturen von Mikroorganismen. Dies führt über Signalkaskaden zur Aktivierung des Immunsystems. Die beiden Nod-ähnlichen Rezeptoren IPAF (auch NLRC4 genannt) sowie Naip5 (neuronal apoptosis inhibitory protein) sind für die Erkennung von zytosolischem *Legionella*-Flagellin verantwortlich und lösen den Caspase-1 und Caspase-7 vermittelten Zelltod aus (Amer *et al.*, 2006, Akhter *et al.*, 2009). Der Einfluss von Naip5 zeigt sich besonders deutlich bei dem permissivem A/J-Mausstamm. Dieser besitzt einen Gendefekt in *naip5* und ist im Gegensatz zu anderen Mausstämmen empfänglich für die Infektion mit Legionellen (Gao & Abu Kwaik, 1999, Diez *et al.*, 2003, Molmeret *et al.*, 2004). Wenn das Ortholog zu Naip5 in humanen Makrophagen oder Lungenepithelzellen fehlt, führt dies ebenfalls zur verstärkten *Legionella*-Replikation. Allerdings werden in menschlichen Zellen weder Caspase-1 noch Caspase-7 bei einer Infektion mit Legionellen aktiviert (Santic *et al.*, 2007, Vinzing *et al.*, 2008, Akhter *et al.*, 2009). Für humane Makrophagen und alveolare Epithelzellen wurde gezeigt, dass *Legionella* bei Verwendung kleiner Zellzahlen zu frühen Infektionsstadien die Aktivierung von Caspase-3 fördert, ohne dabei Apoptose auszulösen. Diese wird erst zu späteren Infektionszeitpunkten nach erfolgter Replikation ausgelöst. Eine Inhibition von Caspase-3 zu frühen Infektionszeitpunkten verhindert die Replikation von *Legionella* und führt zur Fusion mit Endolysosomen. Caspase-3 schneidet Rababin-5, einen downstream Effektor der kleinen GTPase Rab5, in Abhängigkeit von Effektoren des Typ IVB SS. Rab5 ist hierbei an der Reifung von frühen Endosomen beteiligt. Die Spaltung von Rababin-5 führt zur

reduzierten Anlagerung von Rab5-GTP an die LCV, welche somit vom normalen endolysosomalen Abbau ausgeschlossen wird (Gao & Abu Kwaik, 1999, Molmeret *et al.*, 2004, Abu-Zhant *et al.*, 2005). Bisher wurden nur wenige der Effektoren wie z.B. SidF und SdhA identifiziert, die an der Regulation des Wirtszelltods beteiligt sind. SidF interagiert mit pro-apoptotischen Signalwegen, indem es an zwei Mitglieder (Bcl-rambo und BNIP3) der pro-apoptotischen Proteinfamilie Bcl2 bindet (Banga *et al.*, 2007). Auch SdhA ist für das Überleben der Wirtszelle wichtig. Die Mutation von SdhA führt zum Tod infizierter Mausmakrophagen und verhindert die Replikation der Legionellen (Laguna *et al.*, 2006). Außerdem ist bekannt, dass *Legionella*-Effektoren den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren und damit die Transkription anti-apoptotischer Proteine auslösen. Dies verhindert die Apoptose der Wirtszelle und erleichtert den Bakterien die Etablierung einer replikativen Nische (Abu-Zant *et al.*, 2007, Shin *et al.*, 2008). Auf der anderen Seite induziert NF- κ B die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen in Epithelzellen, wodurch das angeborene Immunsystem stimuliert wird (Schmeck *et al.*, 2007).

2.3 Der Wirtsmodellorganismus *Dictyostelium discoideum*

D. discoideum gehört phylogenetisch zu den Mycetozoa und kommt als Einzeller in verschiedensten Böden und verrottetem organischem Material vor. Dictyostelien ernähren sich von Bakterien und einzelligen Pilzen, die sie über Phagozytose aufnehmen (Schaap, 2011).

Innerhalb der Gruppe der Schleimpilze zeichnen sich Dictyostelien durch einen besonderen Lebenszyklus aus und werden daher auch als zelluläre Schleimpilze und „soziale Amöbe“ bezeichnet. Bei schlechten Umweltbedingungen, wie z.B. Nahrungsmangel oder oxidativem Stress, wird ein durch Chemotaxis gesteuerter Differenzierungsprozess eingeleitet, der letztendlich zur Aggregation der Einzeller und Ausbildung von Fruchtkörpern führt. Der Botenstoff cAMP dient hierbei als chemotaktisches Signal und führt zu Bildung eines aus ca. 10^5 Einzelzellen bestehenden multizellulären Aggregats, dem Pseudoplasmodium (*slug*). Gesteuert durch Signale wie Licht, Gas oder Temperatur wandert der mehrzellige „Organismus“ in obere Bodenschichten, um möglichst gute Bedingungen für die Exposition der

Fruchtkörper und die spätere Verteilung der Sporen zu erreichen (Bonner & Lamont, 2005). Sobald geeignete Bedingungen vorliegen, findet die weitere Differenzierung in Stielzellen (tote Zellen) und einen sporenhaltigen Kopf statt. Bei günstigen Umweltbedingungen können erneut einzellige Amöben aus den Sporen auskeimen (Kessin, 2001). Dictyostelien besitzen neben der einfachen mitotischen Zellteilung auch einen sexuellen Lebenszyklus. Hierbei fusionieren zwei Zellen unterschiedlichen Paarungstyps zu einer Zygote und reifen zu Makrozysten aus, in denen die Meiose stattfindet (Abbildung 2.3) (Li & Purugganan, 2011, Schaap, 2011). Eine Besonderheit stellt die Fähigkeit von *D. discoideum* dar, Bakterien in den Fruchtkörpern zu speichern und zusammen mit den Sporen zu verbreiten. In Nahrungsarmen Habitaten sorgen die Amöben somit selbst für ihre Nahrungsgrundlage (Brock *et al.*, 2011).

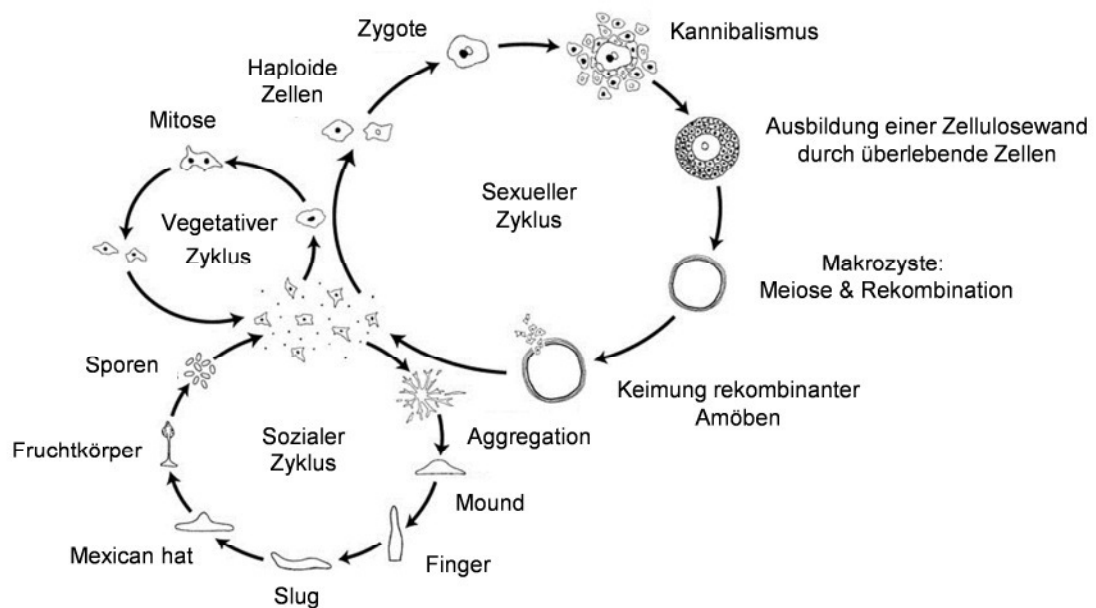


Abbildung 2.3: Lebenszyklus von *D. discoideum* (www.dictybase.org).

Die relativ leichte Kultivierbarkeit im Labor, ein gut etabliertes molekulares Methodenspektrum sowie das vollständig sequenzierte Genom haben dazu beigetragen, dass *D. discoideum* zu einem bedeutenden Modellorganismus der Zellbiologie geworden ist. Das haploide Genom umfasst 34 Mb, die auf 6 Chromosomen verteilt sind. Genetische Analysen belegen, dass *Dictyostelium* hierbei näher mit höheren Eukaryoten als mit Pilzen oder Pflanzen verwandt ist (Loomis & Smith, 1990, Eichinger *et al.*, 2005). Die Ähnlichkeit zu höheren

Eukaryoten ermöglicht es, komplexe zelluläre Prozesse wie Chemotaxis, Zelldifferenzierung, Motilität sowie dazugehörige Signaltransduktionswege zu analysieren. Durch das haploide Genom wirken sich Mutationen direkt auf den Phänotyp aus und besitzen häufig einen Effekt auf den Entwicklungszyklus. Dies erleichtert wiederum das Screening nach Mutanten.

Im Bereich humaner Erb- und Infektionskrankheiten hat *Dictyostelium* ebenfalls an Bedeutung gewonnen. Es wurden allein 33 Gene mit Orthologie zu krankheitsassoziierten Genen im Menschen identifiziert (Eichinger *et al.*, 2005). Auf zellulärer Ebene ähnelt *D. discoideum* in vielerlei Hinsicht humanen Makrophagen und wird erfolgreich zur Aufklärung schwerwiegender Stoffwechselkrankheiten, z.B. Lissenzephalie eingesetzt (Williams *et al.*, 2006). Stoffwechselerkrankungen, die durch lysosomale Dysfunktion hervorgerufen werden, führen oft zur Anreicherung giftiger Substanzen im Organismus und zum frühen Tod der Patienten. Dictyostelien sind im Gegensatz zu Makrophagen in der Lage, unverdauliches Material aus der Zelle auszuscheiden und entgehen dadurch der Anreicherung womöglich toxischer Stoffe. In einigen Fällen ermöglicht dies die Erforschung solcher lysosomaler Krankheiten, die im komplexen humanen System letale Phänotypen hervorbringen und nicht erforscht werden können (Maniak, 2011).

Für die Infektionsbiologie ist der Modellorganismus von besonderem Interesse, da die grundlegenden Abläufe, beginnend mit der Aufnahme von Bakterien und den sich anschließenden Abbauprozessen große Ähnlichkeiten zu humanen Phagozyten aufweisen. Dieser Vorteil wird genutzt, um das intrazelluläre Überleben von Pathogenen wie z.B. *Legionella*, *Salmonella* oder *Mycobacterium* zu untersuchen. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Identifizierung bakterieller Virulenzfaktoren und deren Interaktionspartnern auf Wirtszellseite (Ünal & Steinert, 2006, Joshi & Swanson, 2011). Wichtige zelluläre Prozesse wie der Phosphatidylinositolmetabolismus und Autophagie werden hierbei in Zusammenhang mit Infektionskrankheiten untersucht.

2.3.1 Der Phosphoinositid-Metabolismus

Phosphoinositide (PIs) gehören zu den Glycerolipiden und besitzen eine Schlüsselfunktion für die Regulation diverser zellulärer Prozesse wie der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion, Aktin-Zytoskelett-Modulation, Zelldifferenzierung oder dem „membrane-trafficking“ (DeMatteis & Godi, 2004, Behnia & Munro 2005). PIs besitzen einen hydrophoben Membrananker und eine D-*myo*-Inositolring-Kopfgruppe. Der Inositolring kann an den Hydroxylgruppen der Position 3, 4 und 5 durch Kinasen phosphoryliert bzw. durch Phosphatasen dephosphoryliert und ermöglicht die Bildung sieben verschiedener Derivate (Van den Bout & Divecha, 2009) (s. Abbildung 2.4). Aufgrund ihrer vielfältigen Aufgaben in der Zelle muss eine strikte zeitliche und örtliche Produktion bestimmter PIs erfolgen. Dies geschieht über das Zusammenspiel von Kinasen, Phosphatasen und Phospholipasen mit kleinen GTPasen und anderen Effektorproteinen (Weber *et al.*, 2009a).

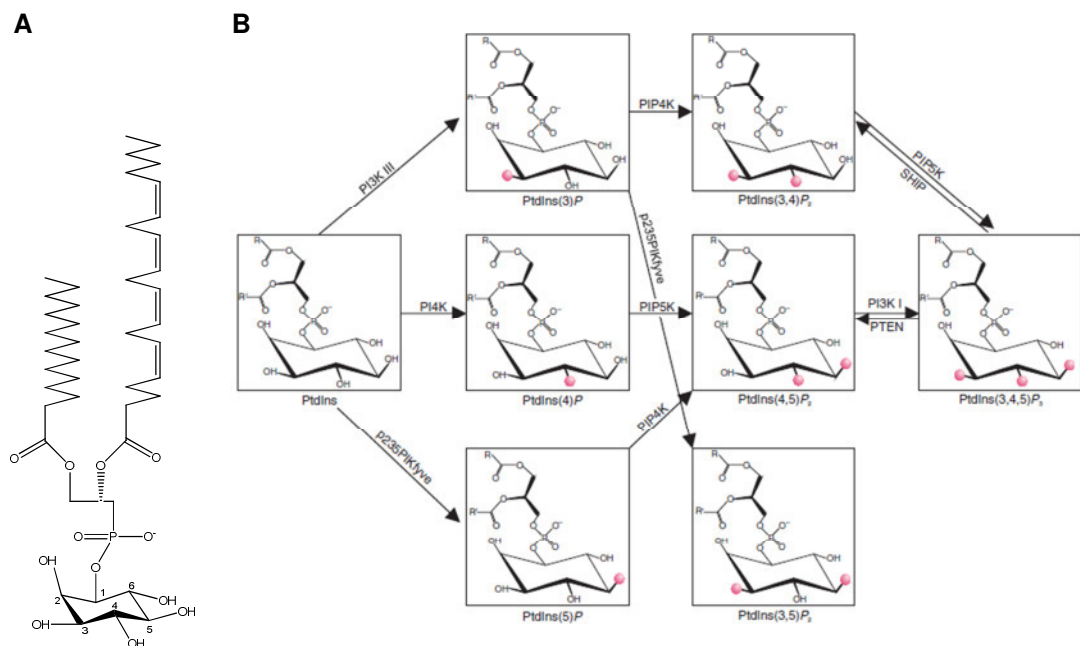


Abbildung 2.4: Grundstruktur von Phosphoinositiden (A). Enzymatische Bildung der sieben PI-Derivate über Kinasen, Phosphatasen und Phospholipasen (B) (Van den Bout & Divecha, 2009).

Intrazelluläre Pathogene wie *Mycobacterium*, *Shigella*, *Salmonella*, *Legionella*, *Listeria* und *Brucella* interferieren ebenfalls mit dem PI-Metabolismus um ihre Aufnahme, die Bildung replikativer Vakuolen oder die Apoptose zu modulieren

und eine replikative Nische in der Wirtszelle zu etablieren (Hilbi, 2006, Weber *et al.*, 2009a). Dies erfolgt hauptsächlich über Effektoren bakterieller Typ III oder Typ IV SS.

Für die Aufnahme von Bakterien über Phagozytose oder Makropinozytose ist das Phosphoinositid PI(4,5)P₂ besonders wichtig. Es ist an der Plasmamembran und dem „phagocytic cup“ lokalisiert und interagiert dort mit Aktin-bindenden Proteinen. Erst wenn PI(4,5)P₂ durch PI3Ks oder Phospholipase C (PLC) zu PI(3,4,5)P₃ bzw. den sekundären Botenstoffen Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) umgesetzt wird, schließt sich das Phagosom. PI3Ks sind außerdem für Bildung von PI(3)P verantwortlich. Dessen Anlagerung an das Phagosom führt zur Rekrutierung der H⁺-ATPase und zur Reifung des bakteriziden Phagosoms (Cardelli, 2001, Clarke *et al.*, 2010).

Legionella-Effektor-Proteine wie SidC (Weber *et al.*, 2006, Ragaz *et al.*, 2008), SidM/DrrA (Machner & Isberg, 2006, Murata *et al.*, 2006) und RalF (Nagai *et al.*, 2002) interagieren ebenfalls mit PIs der Wirtszelle und sind an der Modulation des Vesikeltransports und damit an der Etablierung LCV beteiligt. Durch SidM/DrrA, SidC und sein Paralog SdcA wird z.B. PI(4)P an die LCV gebunden. PI(4)P ist hauptsächlich im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert und an der Regulation des Vesikeltransports beteiligt (Weber *et al.*, 2006). Mutationen von SidC bzw. SdcA zeigen jedoch keine Auswirkung hinsichtlich der Replikation in der Wirtszelle. Ein weiteres Beispiel ist die Interaktion von Legionellen mit PI3Ks. Ihre Inhibition führt zu einer reduzierten Aufnahme von *dot/icm*-Mutanten. Da wildtypische Legionellen unabhängig von PI3Ks aufgenommen werden, scheinen *dot/icm*-Effektoren alternative Aufnahmeprozesse auszulösen (Khelef *et al.*, 2001, Weber *et al.*, 2006). Wie *Legionella*-Effektoren in die PI-Signalkaskaden der Wirtszelle eingreifen ist bisher nicht genau bekannt. Denkbar ist die Aktivierung kleiner GTPasen, die eine gezielte Rekrutierung von PIs an die LCV nach sich zieht, die Maskierung von PIs, eine direkte Inhibition bzw. Aktivierung oder die Nachahmung von Phosphatasen und Kinasen (Hilbi *et al.*, 2011, Viner *et al.*, 2012).

2.3.2 Autophagie

Falsch gefaltete Proteine, Proteinaggregate oder alte bzw. geschädigte Zellorganellen werden durch Autophagie aus dem Zytoplasma entfernt und abgebaut. Dadurch wird die Anreicherung toxischer Stoffe oder Enzyme mit einer Fehlfunktion verhindert. Autophagie ist in Eukaryoten hoch konserviert und spielt für die Aufrechterhaltung von Funktionalität und Vitalität in Zellen eine zentrale Rolle. Vor allem bei ungünstigen Bedingungen wie Nährstoffmangel oder oxidativem Stress sichert Autophagie kurzfristig den Erhalt lebenswichtiger Prozesse der Zelle, indem körpereigene, entbehrliche Zellbestandteile in ihre Makromoleküle aufgeschlossen werden und somit für neue Biosynthesen zur Verfügung stehen.

Makro-, Mikro- und die Chaperon-vermittelte Autophagie bilden die drei Hauptformen der Autophagie. Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden kleine Proteine aus dem Zytoplasma über die Membran des Lysosoms transportiert und im Lumen degradiert. Mikro- und Makroautophagie sind für den Abbau großer Proteinkomplexe bzw. ganzer Zellorganellen verantwortlich, die nicht durch den proteasomalen Abbau aus dem Zytoplasma entfernt werden können. Mikroautophagie bezeichnet die direkte Aufnahme zytosolischer Komponenten durch Lysosomen. Bei der Makroautophagie (fortlaufend als Autophagie bezeichnet) erfolgt die *de novo* Synthese einer Lipiddoppelmembran im Zytoplasma. Diese umschließt Teile des Zytoplasmas sowie darin enthaltene und für den Abbau markierte Substrate. Durch die anschließende Fusion des gebildeten Autophagosoms mit Lysosomen wird der Inhalt im sogenannten Autolysosom degradiert (Massey *et al.*, 2004, Dargemont & Ossareh-Nazari, 2012). In den letzten Jahren wurde deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen Autophagie und vielen wichtigen Zellfunktionen wie der Zellentwicklung, Alterung, Tumorsuppression und der Abwehr von Pathogenen besteht (Dorn *et al.*, 2002, Calvo-Carrido *et al.*, 2010, Joshi & Swanson, 2011, Yuk *et al.*, 2012). Defekte im Autophagiestoffwechsel sind unter anderem für die Entstehung von Parkinson, Alzheimer sowie Krebs verantwortlich (Xie & Klionsky, 2007).

2.3.3 Mechanismus und Regulation der Autophagie

Der Abbau und Aufbau von Molekülen oder Biomasse sind allgegenwärtige Prozesse in Eukaryoten, die auf eine gewisse Grundaktivität der Autophagie angewiesen sind. Dies geschieht z.B. bei der Remodellierung von Geweben während der Embryogenese (Cecconi & Levine, 2008). Bisher wurden 35 „**autophagy** related genes“ (ATG) in *S. cerevisiae* identifiziert, die im Zusammenspiel mit weiteren Proteinen zur Bildung des Autophagosoms führen (Dargemont & Ossareh-Nazari, 2012). Unter Eukaryoten verläuft der Prozess ähnlich und kann prinzipiell in drei Schritte aufgeteilt werden (s. Abbildung 2.5): (1) Ausbildung der Isolationsmembran im Zytoplasma (Phagophore), (2) Vesikelreifung und umschließen der Fracht (Autophagosom), (3) Fusion mit Lysosomen und Rückgewinnung von Makromolekülen (Autolysosom). Autophagie unterliegt einer komplexen Regulation und wird von vielen Faktoren wie z.B. dem Nährstoffangebot, oxidativem Stress oder der Temperatur beeinflusst. Die Kinase TOR (**t**arget **o**f **r**apamycin) besitzt hierbei eine Schlüsselfunktion und kontrolliert die Bildung von Autophagosomen. TOR nimmt eine Vielzahl äußerer Signale (Nährstoffe, Wachstumsfaktoren, Aminosäuren) wahr.

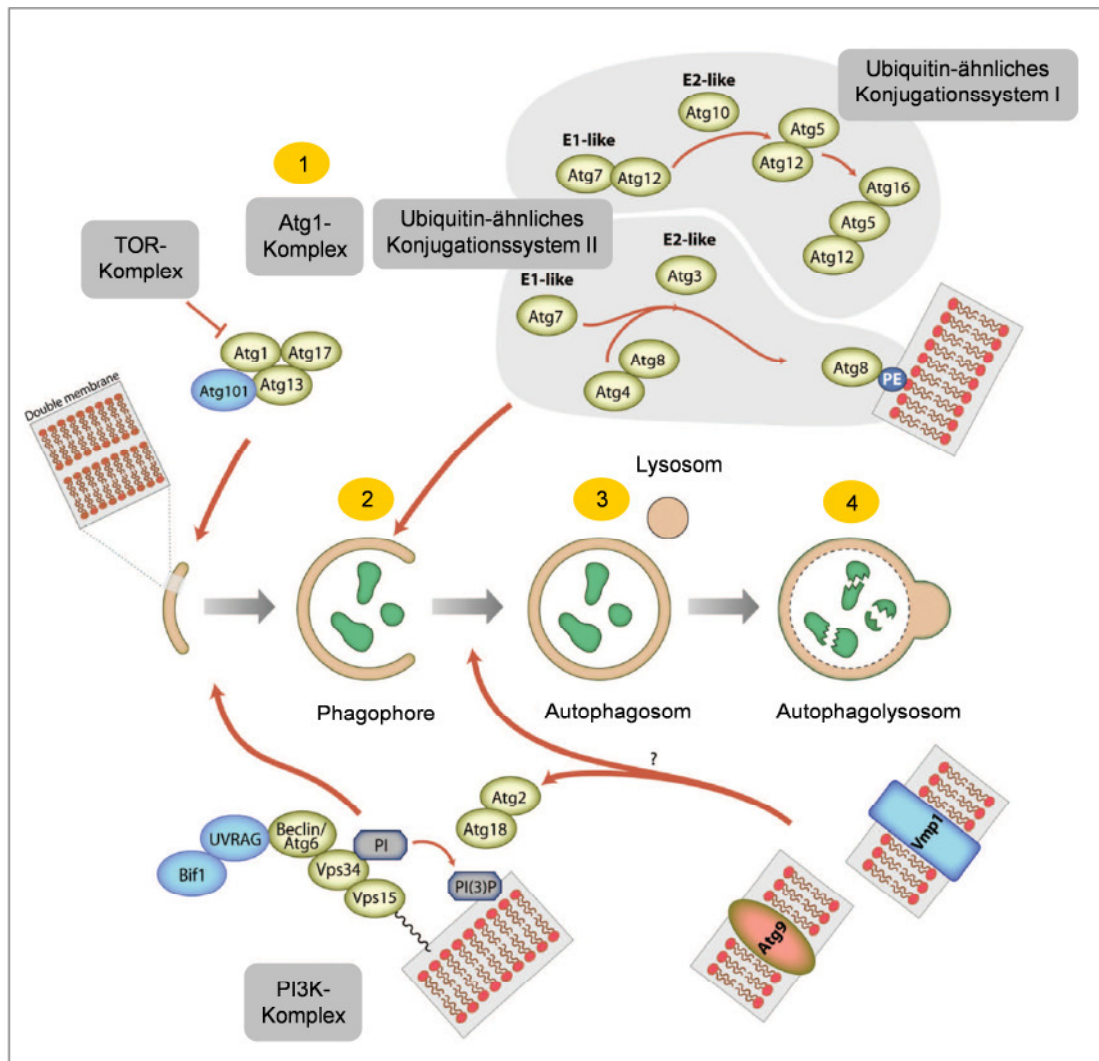


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Autophagie in *Dictyostelium*. Die TOR-Kinase TORC1 nimmt eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Autophagie ein. TOR reguliert in Abhängigkeit der Nährstoffversorgung die Bildung des Atg1-Komplexes. Dieser ist essentiell für die Ausbildung der Isolationsmembran (Phagophore) und wird bevorzugt unter Nährstoffmangel gebildet (1). Der PI3K-Komplex Vps34 führt zur Bildung von PI3P und ist wahrscheinlich für die Anlagerung weiterer Autophagieproteine und Reifung der Phagophore beteiligt. Für die Expansion und Biegung der Membran sind zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme E1 und E2 verantwortlich (2). Die Funktion der beiden Transmembranproteine Atg9 und Vmp1 ist nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass sie an der Rekrutierung von Membran an die Phagophore beteiligt sind. Das gebildete Autophagosom (3) fusioniert schließlich mit Lysosomen (Autophagolysosom). Die innere Membran sowie der Inhalt des Autophagosoms werden durch lysosomale Enzyme degradiert (4) (verändert nach Calvo-Carrido *et al.*, 2010).

Sind genügend Nährstoffe vorhanden, wird Atg13 durch TOR phosphoryliert und verhindert die Bildung des Atg1-Komplexes sowie der Isolationsmembran. Bei schlechten Nährstoffverhältnissen wird TOR inaktiviert und es kommt zur Dephosphorylierung von Atg13. In dieser Konformation bindet Atg13 mit hoher Affinität an Atg1. Im Folgenden werden unter Beteiligung des

Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Komplexes bestehend aus Vps34, Atg6 und Vps15 weitere Atg-Proteine angelagert und die Isolationsmembran (Phagophore) gebildet. An der weiteren Vervollständigung (Elongationsphase) der autophagosomalen Membran sind zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme beteiligt. Diese bestehen aus Atg16-Atg5-Atg12 bzw. aus Atg8. Da sich Atg16-Atg5-Atg12 hauptsächlich auf der Außenseite der Phagophore befinden und nach Bildung des Autophagosoms in das Zytoplasma abgegeben werden, wird vermutet, dass der Komplex zur Biegung und Formgebung des Autophagosoms beiträgt, indem er sich wie ein Mantel um die Phagophore legt. Atg8 ist essentiell für die Expansion der Phagophore. Unter Mitwirkung von Atg7, Atg3 und Atg8-Atg4 wird es an das Lipid Phosphatidylethanolamin (PE) gebunden und als PE-Atg8 in der autophagosomalen Membran verankert (Xie *et al.*, 2008).

Die Funktion der Transmembranproteine Atg9 und Vmp1 ist noch nicht eindeutig geklärt. Wahrscheinlich sind sie an dem Transport von Membranen während der Bildung des Autophagosoms beteiligt. Das Transmembranprotein Atg9 trägt zur korrekten Lokalisation von PE-Atg8 an die Phagophore bei. Nach der Schließung des Autophagosoms diffundieren die meisten Atg-Proteine zurück ins Zytoplasma. Nur Atg8 (LC3 in Hefe, p62 in Säugern) befindet sich noch zu einem geringen Anteil auf der Innenseite des Autophagosoms und wird aus diesem Grund als Autophagosomenmarker verwendet. Auf der äußeren Membran befindliches Atg8 wird hingegen durch Atg4 abgespalten. Schließlich fusioniert das Autophagosom mit Lysosomen (Autophagolysosom) und der Inhalt sowie die innere Membran werden durch hydrolytische Enzyme abgebaut (Deretic & Levine, 2009, Calvo-Garrido *et al.*, 2010).

Anhand der Autophagosomenmarker Atg8/LC3 zeigten neuere Studien eine Beteiligung des Chaperon-ähnlichen Proteins Cdc48 in Hefe (p97 oder VCP in Säugern; CdcD in *Dictyostelium*) an der autophagosomalen Degradation von ubiquitinierten Proteinaggregaten. Dies stand der bisherigen Annahme, dass es sich bei Autophagie-vermittelten und Ubiquitin-vermittelten Abbauprozessen um zwei unabhängige Prozesse handelt entgegen (Kirkin *et al.*, 2009). Patienten mit Mutationen in *p97* weisen nicht nur Ablagerungen von ubiquitinierten Proteinaggregaten in betroffenen Geweben (Knochen, Gehirn, Muskeln) auf,

sondern zeigen zusätzlich die Anreicherung der Autophagosomen-Marker Atg8/LC3. Dies führt schließlich zur Bildung unreifer Autophagosomen, den „rimmed vacuoles“ (Ju & Wehl, 2009). Das Krankheitsbild äußert sich u.a. in Muskelschwäche oder Gewebsschwund und wird unter dem Begriff Multisystematropie (IBMPFD, „inclusion body myopathy associated with paget disease of bone and frontotemporal dementia“) zusammengefasst (Kimonis *et al.*, 2008). IBMPFD ist ein Sammelbegriff für Einschlusskörpermyolitis (IBM, „inclusion body myopathy“), Morbus Padgett (PDB, „padgett disease of bone“) und Frontotemporale Demenz (FTD, „frontotemporal dementia“). Das Protein p97 gehört zur Familie der AAA-ATPasen und ist an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse wie der Ubiquitin-vermittelten Degradation von Proteinen (UPS, „ubiquitin proteasome system“), der ER-assoziierten Degradation (ERAD, „endoplasmic-reticulum-associated protein degradation“) aber auch an DNA-Reparaturprozessen beteiligt. Der UPS-vermittelte Abbau findet selektiv, direkt nach der Bildung falschgefalteter Proteine statt. Autophagie wird hingegen für die Degradation langlebiger Proteine, alter Organellen oder Proteinaggregaten induziert. Beide Abbauprozesse sind essentiell an der Qualitätskontrolle der Zelle beteiligt und ein Verlust würde letztendlich zur Degeneration der Zelle führen. Es wird angenommen, dass p97 als Ubiquitin-abhängiges Chaperon eine Schlüsselfunktion in der Koordination zwischen dem Autophagie-vermitteltem und dem Proteasom-vermittelten Abbauprozess darstellt. Wie genau p97 und seine Kofaktoren diesen Prozess steuern ist jedoch unklar (Ju & Wehl, 2009). AAA-ATPasen können ubiquitinierte Substrate z.B. aus Proteinkomplexen oder Zellmembranen isolieren und dem Proteasom-vermittelten Abbau zuführen. Findet dieser Prozess nicht statt, wird die anschließende Fusion mit Lysosomen und folglich die Degradation des Autophagosomen-Inhalts verhindert. Eine Mutation des Kofaktors Shp1 in Säugern (p47 in Hefe) verhindert die Vervollständigung der Phagophore zum Autophagosom. Shp1 interagiert mit der Membrangebundenen Form von Atg8/LC3. In Bezug auf die Autophagie spielt p97 wahrscheinlich eine Rolle bei der Segregation von PE-Atg8 aus der Membran um die vollständige Bildung des Autophagolysosoms zu ermöglichen (Tresse *et al.*, 2010, Yamanaka *et al.*, 2011, Thumm & Klionsky, 2011).

2.3.4 Autophagie und Interaktionen mit pathogenen Bakterien

Autophagie spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr gegenüber intrazellulären Pathogenen und wird in diesem Zusammenhang als Xenophagie bezeichnet (Deretic & Levine, 2009, Levine *et al.*, 2011, Yuk *et al.*, 2012). Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, erkennen und vernichten die Phagozyten des angeborenen Immunsystems eingedrungene Mikroorganismen. Einige intrazelluläre Pathogene haben jedoch Mechanismen entwickelt, um dem Abbau zu entgehen. *Salmonella enterica* oder Gruppe A Streptokokken produzieren Virulenzfaktoren, die zur Lyse des Phagosoms führen und die bakterielle Replikation im Zytoplasma ermöglichen. Autophagie ist eine Möglichkeit des Immunsystems, zytoplasmatische Pathogene durch die Bildung von Autophagosomen abzubauen. Die Bakterien werden ubiquitiniert und dem autophagolysosomalen Abbau zugeführt (Joshi & Swanson, 2011, Yuk *et al.*, 2012). Autophagie dient auch als zusätzlicher Abwehrmechanismus für fakultativ intrazelluläre Pathogene wie *Mycobacterium tuberculosis* oder *Toxoplasma gondii*. So verhindert eine vorherige Induktion von Autophagie durch Nährstoffmangel oder über INF- γ die Vermehrung von *M. tuberculosis* (Gutierrez *et al.*, 2004). Auf der anderen Seite gibt es Pathogene wie *Coxiella burnetii* und *Porphyromonas gingivalis*, die eine Bildung von Autophagosomen fördern und zu ihrem Vorteil nutzen. Die gezielte Induktion von Autophagie fördert sogar die Infektionsrate von *C. burnetii* (Colombo, 2007).

Welche Rolle die Autophagie während der Infektion mit Legionellen spielt, wird kontrovers diskutiert. Die LCV ähnelt in vielerlei Hinsicht Autophagosomen. Frühe Autophagosomen sowie LCVs weisen Membranen auf, die dem ER ähneln und in der weiteren Reifung ubiquitiniert werden (Dorn *et al.*, 2002, Calvo-Carrido *et al.*, 2010). Weiterhin wird der Autophagosomenmarker LC3 auf beiden Vakuolen angelagert. Ein Unterschied besteht jedoch in der Reifung zu Autophagolysosomen, die bei der LCV stark verzögert erfolgt und in Kapitel 2.2.4 detailliert beschrieben wurde. Otto *et al.* postulierten zunächst, dass Autophagie keine Rolle für die Etablierung der *Legionella*-Infektion spielt. Deletionen von *atg1*, *atg5*, *atg6*, *atg7* oder *atg8* hatten keine Auswirkung auf den Infektionsverlauf (Otto *et al.*, 2004a, b). Transkriptomstudien in *D. discoideum* zeigten hingegen eine deutliche Regulation von *atg8*, *atg9* und

atg16 im Vergleich von Infektionen mit virulenten und avirulenten Legionellen (Farbrother *et al.*, 2006).

2.4 Therapiemöglichkeiten zur Bekämpfung intrazellulärer Pathogene

Es existiert eine Vielzahl an Antibiotika mit einer hohen extrazellulären Wirkung auf Gram-negative und Gram-positive Bakterien. Ihr Einsatz bei Infektionen mit intrazellulären Pathogenen ist jedoch häufig dadurch limitiert, dass sie eine geringe Penetrationsfähigkeit besitzen, bei sauren pH-Werten in Lysosomen inaktiviert werden oder eine hohe Diffusionsrate aufweisen. Hierzu zählen β -Lactam-, Aminoglykosidantibiotika bzw. Chinolone. Zu den derzeit verwendeten, membrangängigen Antibiotika gehören Fluorochinolone (z.B. Ciprofloxacin, Levofloxacin) und Makrolide (z.B. Erythromycin, Azithromycin). Viele der heutzutage eingesetzten Antibiotika wurden vor mehreren Jahrzehnten entdeckt. Problematisch sind in diesem Zusammenhang die zunehmende Entwicklung von multiresistenten Erregern, z.B. multiresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) und die rückläufige Anzahl neuer Wirkstoffformulierungen. Besonders bei intrazellulären Erregern ist es daher von Interesse, Wirkstoffträgersysteme zu entwickeln, mit deren Hilfe auch die bisher nur extrazellulär aktiven Antibiotika direkt an den Ort der Infektion gebracht werden können. Eine Möglichkeit bietet die Verkapselung von Wirkstoffen in Liposomen oder Nanopartikeln (Pinto-Alphandary *et al.*, 2000). Da Liposomen aus körpereigenen Lipiden bestehen, gelten sie als biokompatibel, besitzen eine geringe Immunogenität und sind in den meisten Fällen nicht zytotoxisch. Nachteilig sind jedoch die aufwendige und kostenintensive Produktion sowie die kurze Lebensdauer der Liposomen (Schiffelers *et al.*, 2001, Kelly *et al.*, 2010).

2.4.1 Liposomen als Wirkstoffträgersystem

Liposomen bestehen aus ein oder mehreren Lipiddoppelschichten, die einen wässrigen Innenraum umschließen und 20 nm bis 10 μ m große Vesikel bilden. Sie entstehen dadurch, dass sich Phospholipide in wässrigen Lösungen

spontan zu einer Kugel zusammenlagern. Liposomen wurden erstmals im Jahr 1964 von Bangham und Horne beschrieben, welche den Stofftransport über artifizielle biologische Membranmodelle erforschten (Bangham & Horne, 1964, Bangham *et al.*, 1995). Der heutige Name geht auf das griechische Wort „lipo“ für Fett und „soma“ für Körper zurück und wurde durch Sessa und Weissmann geprägt (Sessa & Weissmann, 1968). Aufgrund ihrer amphiphilen Struktur sind Liposomen besonders für pharmazeutische Anwendungen geeignet, da sowohl hydrophile Wirkstoffe im wässrigen Innenraum als auch hydrophobe Wirkstoffe in den Lipiddoppelschichten eingeschlossen werden können (Voigt 2010). Liposomen werden sehr schnell über Phagozyten unseres Immunsystems im Blutstrom aufgenommen und mit Präferenz in die Leber und Milz transportiert (Schneider, 1985, Schroit *et al.*, 1987). Die Aufnahme erfolgt meist mittels Endozytose. Diese kann Rezeptor-unabhängig oder Rezeptor-abhängig erfolgen. Scavenger-, Lektin oder Fc-Rezeptoren gehören zu den bekannten Rezeptoren, die oft auf der Oberfläche von phagozytierenden Zellen, z.B. von Makrophagen zu finden sind. Diese schnelle Aufnahme der Liposomen ist jedoch nicht immer gewünscht, da sich viele Pathogene auch in anderen Organen vermehren. In den letzten 40 Jahren wurde daher verstärkt untersucht, wie sich die unterschiedliche Größe, Ladung und Lipidzusammensetzung auf die Verteilung der Liposomen im Körper auswirken. Die Modifikation der Oberflächenstruktur durch Anlagerung von Antikörpern, Mono- oder Oligosacchariden und Peptiden ermöglicht außerdem die spezifische Bindung der Liposomen an Zielzellen (s. Abbildung 2.6). Hierdurch können Antibiotika gezielt in einzelnen Zellpopulationen oder Geweben angereichert werden. Der Einbau von Polyethylenglykol (PEG) bietet die Möglichkeit, die Zirkulationsdauer der Liposomen im Blutstrom zu erhöhen und eine konstante Freisetzung zu bewirken. Da Komplementfaktoren durch die sterische Hinderung von PEG weniger gut an die Liposomen binden können, findet somit eine langsamere Aufnahme durch Phagozyten statt. Hierdurch kann die Gabe hoher und häufiger Antibiotikakonzentrationen reduziert werden (Torchilin, 2005, Immordino *et al.*, 2006).

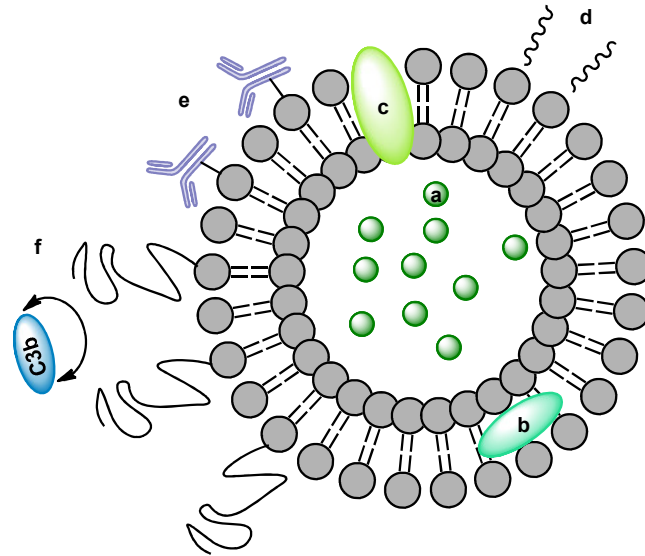


Abbildung 2.6: Liposom als Wirkstoffträgersystem. Hydrophile Wirkstoffe können im wässrigen Innenraum des Liposoms verkapselt werden (a), hydrophobe Wirkstoffe in der Lipiddoppelschicht (b) und amphiphile zwischen den Phospholipidmolekülen (c). Durch Modifikation der äußeren Membran, z.B. durch Anlagerung bestimmter Zuckerreste (d) oder Antikörper (e) kann die Bindungsspezifität an ausgewählte Zielzellen erhöht werden. Die Integration von PEG verlängert die Zirkulationsdauer von Liposomen im Blutstrom. Durch die sterische Hinderung lagern sich Komplementfaktoren wie C3b wesentlich langsamer an (f).

In vivo werden Liposomen hauptsächlich über Rezeptor-abhängige oder -unabhängige Endozytose in Zellen aufgenommen. Bei der Rezeptor-abhängigen Endozytose binden die Liposomen je nach Ligand an Fc-Rezeptoren (Immun LS), Scavenger-Rezeptoren (anionische Liposomen), Lektin-Rezeptoren (manosylierte Liposomen) oder Integrin-Rezeptoren (Peptid Liposomen) (Buri & Gumma, 1985, Torchilin, 2005, Kelly, 2010). Das entstehende Endosom fusioniert im Anschluss mit Lysosomen. Der veränderte pH-Wert sowie die lysosomalen Enzyme degradieren die Liposomenmembran und bewirken eine Freisetzung des Wirkstoffes. Alternativ kann das Liposom selbst eine Destabilisierung der Endosomenmembran auslösen und der Wirkstoff gelangt direkt ins Zytoplasma der Zelle. Die Vesikel können außerdem mit der Zellmembran fusionieren, wobei der Inhalt ebenfalls direkt ins Zytoplasma gelangt. Bei einigen Liposomenpräparationen wird die Adsorption an die Zellmembran mit anschließender Freisetzung des Liposomeninhalts beobachtet. Dieser wird anschließend über Mikropinozytose in die Zelle aufgenommen (s. Abbildung 2.7). Über welchen Mechanismus die Liposomen aufgenommen werden, ist abhängig von der Lipidzusammensetzung, der Größe und der Oberflächenmodifikation der Liposomen.

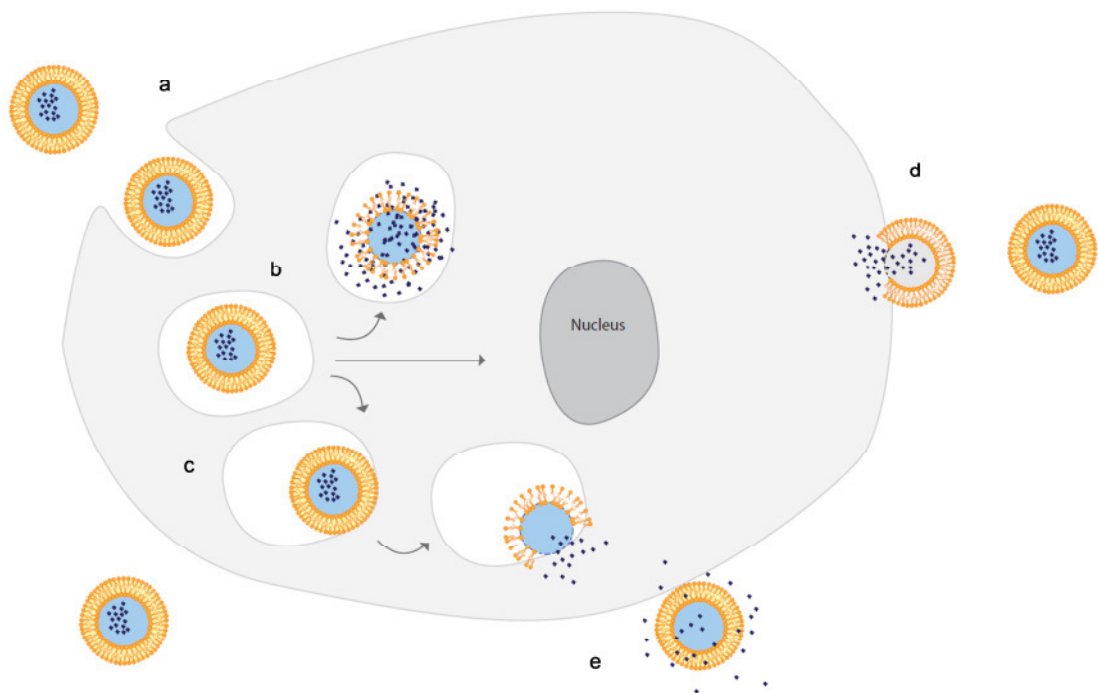


Abbildung 2.7: Aufnahme von Liposomen und Wirkstofffreisetzung in eukaryotischen Zellen. Liposomen gelangen in Abhängigkeit von ihrer Größe, der Lipidzusammensetzung und Oberflächenmodifikation über unterschiedliche Wege in die Zelle. Meist erfolgt die Aufnahme über Rezeptor-abhängige oder -unabhängige Endozytose (**a**). Das Endosom fusioniert mit Lysosomen, wodurch das Liposom durch pH-Wert-Änderung und lytische Enzyme abgebaut wird (**b**). Alternativ kann dies auch eine Fusion von Liposomen und Endosomenmembran auslösen wodurch der Wirkstoff in das Zytoplasma der Zelle gelangt (**c**). Weiterhin können Liposomen mit der Wirtszellmembran fusionieren und den Wirkstoff ins Zytoplasma abgeben (**d**). Bei einigen Liposomenderivaten erfolgt die Freisetzung des Wirkstoffs durch Diffusion in das umgebende Medium (**e**) (verändert nach Torchilin, 2005).

2.4.2 Vorteile von Liposomen in der medizinischen Anwendung

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass sich Liposomen als Wirkstoffträgersystem zur Bekämpfung intrazellulärer Infektionen durch Bakterien, Pilze und Viren gut eignen. Einige Antibiotika, wie das Aminoglykosidantibiotikum Gentamicin, zeigen eine starke antibakterielle Wirkung auf ein großes Spektrum an Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien. Ihr Einsatz ist jedoch bei Infektionen durch intrazelluläre Pathogene durch die geringe Penetrationsfähigkeit in Zellen und zusätzlich durch die Oto- und Nephrotoxizität eingeschränkt (Sundin *et al.* 2001, Schneider & Richling 2002). Im Vergleich mit freiem Gentamicin führte die Verkapselung in Liposomen zu einer verringerten Toxizität und zu einer Reduktion verschiedener intrazellulärer Pathogene wie *S. typhimurium*, *S. enterica*,

Listeria monocytogenes und *Brucella abortus* (Dees *et al.*, 1985, Lutwyche *et al.*, 1998, Cordeiro *et al.*, 2000). So konnte eine Infektion mit *Salmonella dublin* in Mäusen erfolgreich durch Gentamicin-beladene Liposomen behandelt werden. Alle Tiere überlebten nach der intravenösen Gabe von 20 mg/kg verkapseltem Gentamicin, wohingegen dieselbe Dosis an freiem Gentamicin keinen Effekt hatte (Fierer *et al.*, 1990).

Einige Liposomenderivate finden heute bereits Anwendung in der Medizin. Amphitromycin B-Liposomen werden z.B. zur Bekämpfung systemischer Pilzinfektionen eingesetzt. Die Verwendung von liposomalem Amphitromycin B reduziert außerdem die Humantoxizität gegenüber dem freien Wirkstoff und zeigt eine bessere Verträglichkeit in immunsupprimierten Patienten (Lopez-Berestein *et al.*, 1987, Sculier *et al.*, 1988). Liposomen bieten die Möglichkeit verschiedenste Substanzen zu verkapseln und über Modifikationen der Lipidzusammensetzung und Oberfläche eine zielgerichtete Applikation zu erreichen. Dies verringert im Idealfall die Zytotoxizität für den Organismus und die benötigte Menge des eingesetzten Wirkstoffes. In den meisten Fällen wird ein Großteil des Antibiotikums über den Urin ausgeschieden. Die Oberflächenmodifikation von Liposomen mit PEG stellt nur eine von vielen Möglichkeiten dar, die Verweildauer der Liposomen im Blutstrom und damit eine langsame Dosierung des Wirkstoffes zu erreichen. Auch im Bereich der Krebstherapie werden Liposomen eingesetzt. Doxorubicin wirkt gegen metastasierendes Mammakarzinom und befindet sich zurzeit in der klinischen Phase II (Pinto-Alphandary *et al.*, 2000, Schubert, 2010).

2.4.3 Herstellung von Liposomen

Die Herstellung von Liposomen erfolgt durch Dispergieren von Phospholipiden in wässrigen Medien. Durch anschließende Filtration oder Größenausschlusschromatographie entstehen Liposomen mit definiertem Durchmesser von 0,2-10 µm. Sie werden nach ihrer Größe und der Anzahl an Lipiddoppelschichten in unilamellare und multilamellare Liposomen unterteilt. Seit den frühen 70er Jahren wurden etliche Herstellungsverfahren für Liposomen entwickelt und optimiert. Szoka und Papahadjopoulos gehörten zu den Vorreitern und entwickelten das Verfahren der reverse phase evaporation

(REV). Der Wirkstoff befindet sich hierbei in der wässrigen Phase und wird mit einem organischen Lösungsmittel (z.B. Diethylether) und den vorhandenen Phospholipiden emulgiert. Durch kurze Ultraschallbehandlung erfolgt die Bildung von Lipidmonolayern an den Grenzflächen des Wasser-in-Öl-Systems. Unter Vakuum wird schließlich das Lösungsmittel entfernt und es entstehen Phospholipid-Bilayer-Vesikel. Je nach Zusammensetzung der Lipidmembran und des gewählten Wirkstoffes wurden Beladungseffizienzen von 30-65 % erzielt (Szoka & Papahadjopoulos, 1978, Buri & Gumma, 1985). Eine neuere Methode beschreibt die sogenannte „dual asymmetric centrifugation“ (DAC). In einem Gefäß wird eine konzentrierte Phospholipidlösung zusammen mit dem Wirkstoff zentrifugiert und dabei gleichzeitig um die eigene Achse rotiert. Die Kombination zweier entgegengesetzter Rotationen führt zur Ausbildung von Scherkräften und einer effizienten Homogenisierung der Probe. Das Verfahren erlaubt die Produktion kleiner, steriler Volumina unilamellarer Liposomen mit Verkapselungsraten von ca. 56 % (± 3 %) und ist weniger zeitaufwendig als die REV (Massing *et al.*, 2008). Die Zusammensetzung der Lipidbilayer variiert, wobei in den meisten Fällen ein Phospholipid-Cholesterolgemisch verwendet wird (Jesorka & Orwar, 2008). Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol sind häufig Bestandteil der Liposomenmembran. Zusammen mit den verwendeten Lipiden beeinflusst Cholesterol sowohl die Fluidität als auch die Permeabilität der Liposomen. Werden hauptsächlich Lipide mit ungesättigten Fettsäureresten eingesetzt, so reduziert eine Zugabe von Cholesterol die Permeabilität für die verkapselten Substanzen (Ranade & Cannon, 2011).

3 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in die Bereiche der Pathogen-Wirts-Interaktion von *Legionella* mit PMNs (I) und dem Modellsystem *Dictyostelium* (II), der Isolation neuer Wirkstoffe aus *B. pumilus* (III) und der Verwendung von Liposomen als Wirkstoffträgersystem zur Bekämpfung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen (IV).

- (I) Legionellen sind in der Lage PMNs zu infizieren und bei diesen einen inaktivierten Phänotyp hervorzurufen. Anhand qRT-PCR-Studien sollte geklärt werden, in wieweit Legionellen hierbei in die Genregulation von PMNs eingreifen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob Legionellen die Ausbildung von NETs induzieren.
- (II) Anhand von definierten Deletionsmutanten und Komplementanten des Modellorganismus *D. discoideum* sollte die Rolle verschiedener Wirtsproteine auf die Infektion mit Legionellen analysiert werden. Ziel war es, detailliertere Informationen über Faktoren des PI-Metabolismus sowie der Autophagie zu erhalten.
- (III) Während der Durchführung dieser Arbeit wurde ein Bakterium gefunden, dass spezifisch Legionellen im Wachstum inhibiert. Nach der Identifikation des Bakteriums waren die Aufreinigung, Identifikation und Charakterisierung des Wirkstoffes sowie dessen Wirkmechanismus von Interesse.
- (IV) Schließlich sollte der Einsatz Gentamicin-haltiger Liposomen der Firma Rodos BioTarget GmbH zur Behandlung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen in Makrophagen und Lungenepithelzellen analysiert werden. Gentamicin ist nicht in der Lage Membranen zu penetrieren, besitzt extrazellulär allerdings eine gute Wirksamkeit auf Legionellen. Ziel war es, mit Hilfe der Liposomen das Antibiotikum über die Membran in die infizierten Zellen zu transportieren und somit die Replikation von *Legionella* zu verhindern.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Chemikalien

4.1.1 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Alphabetische Auflistung verwendeter Geräte.

Gerät	Hersteller	Typ
Automatische Pipette	Brand	Handy Step [®] electronic
Agilent 2100 Bioanalytiker	Caliper Lifesciences	LabChip
Ein-Kanal-Pipette	Rainin	Pipet lite L2, L10, SL20, SL200, SL1000, G0702508K
	Brand	Transferpipette [®] S 20, 200, 1000
Zwölf-Kanal-Pipette	Rainin	Pipet lite L 12-20, L12-200
DNA-Gelkammer	GP Kunststofftechnik	Mini
Elektroporator	Boi-Rad	CE Module GenePulser Xcell [™] ShockPad [™]
Feinwaage	Sartorius	TE 214S
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Axiovert 200M
Gefrierschrank -20 °C	Siemens	Öko Plus
Gefrierschrank -80 °C	Sanyo	Ultra Low MDF-U73V
Gefrierkontainer	Nalgene	Mr. Frosty [™]
Geldokumentationsanlage	DC Science Tec	DeVision G
	Wealtec	UV-Transiluminator
Heizplatte	BLB	
Hybridisierungssofen	Peqlab	PerfectBlot
Inkubator	Sanyo	MCO-18AIC (UV) MIR-253
Kühlschrank	Liebherr	Comfort
Lumineszenz Spectrometer	Perkin Elmer	LS 50 B
Magnetrührer	IKA [®]	REO basicC RH basic2 Yellow-line MSH basic
Mikroskop	Zeiss	Axioskop MI 100 Axiovert 35M
	Olympus	SZH-ILLK
NanoDrop [™] Spektralphotometer	Peqlab	ND-1000 Spectrophotometer
Netzgeräte	Peqlab	EV222 EV231
pH-Meter	Metrohm	827 pH lab
Photometer	Biochrom	Libra S22
Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad	CFX96 Optical Reaction Module C1000 Thermal Cycler
Reinstwasseranlage	Millipore	Milli-Q Sythesis A10
Rotationsverdampfer	Heideolph	WB 2000 VV 2000
Schüttler	Infors AG	Orbitron

Gerät	Hersteller	Typ
SDS-Gelkammer	Biorad	Mini-Protean Tetra Cell Mini Protean 3
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific	Hera safe
Thermoblock	Eppendorf	Thermomixer comfort
	Peqlab	Thriller
Thermocycler	Peqlab	Pegstar 96 Universal Gradients
HP-UVIS UV-Kabinett	DESAGA	HP-UVIS
Vakuumpumpe	Gilson@Safe	Aspiration Station
	KNFJ LAB	Laboport
	Büchi	V-700
Vortexer	Scientific industries	VortexGenie 2
Waage	Sartorius	TE 3102S
	SCALTEC	SBA 51
Wasserbad	GFL	1002
Xenonlampe	Osram	XBO
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal	Assistent
Zentrifuge	Beckmann Coulter	Allegra X12-R
	Eppendorf	Centrifuge 5424 Centrifuge 5810 R MiniSpin®
	Sigma	2 K 15 C

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Für diese Arbeit wurden die gängigen Verbrauchsmaterialien wie serologische Pipetten, Pipettenspitzen, Einwegküvetten, Sterilfilter, Reaktionsgefäße und Petrischalen von den Firmen Sarstedt, Eppendorf, BD Falcon, Brand, Greiner bio-one, Schott und TPP bezogen. Besondere Verbrauchsmaterialien und Kits sind in Tabelle 4.2 bzw. Tabelle 4.3 aufgelistet.

Tabelle 4.2: Alphabetische Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller	Typ
Blutagar BD Columbia Agar mit 5 % Schafsblut	BD	PA-254005.04
Blutentnahme-Röhrchen	Sarstedt	S-Monovette (Lithium-Heparin
Chromatographiepapier	Machery&Nagel	814030
DC Kieselgel 60 F254	Merck	4AJ-9130050
Chamber Slides	Ibidi	µ-Slide 8-Well (80826)
Faltenfilter	Machery&Nagel	REF 531018
Injektionskanüle	Ochs Laborbedarf	0,90x120 mm 20Gx4-6/8“
Multiplate™ Low-Profile PCR Plates	Bio-Rad	96-Well (MLL 9601)
PCR Sealers™	Bio-Rad	MSB 1001
Sterilfilter	TPP Sarstedt	Filter-Top 500 mL, 0,22 µm (99505) Filtropur S 0.2, 0,2 µm (REF 83.1826.001)

Bezeichnung	Hersteller	Typ
Zellkulturflaschen	BD Falcon	25 cm ² (353108)
	TPP	75 cm ² (90076)
	TPP	150 cm ² (90151)
Zellkulturplatten	Sarstedt	6-Well (83.1839)
	Sarstedt	24-Well (83.1836)
	Sarstedt	96-Well (82.1582.001)
	TPP	96-Well (92696)
	Greiner Bio-one	24-Well (662160)

Tabelle 4.3: Alphabetische Auflistung verwendeter Kits.

Bezeichnung	Hersteller	Typ
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies	5067-1511
Nucleo Spin RNA II	Machery & Nagel	740955.50
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen	205311
RTP DNA/RNA Virus Mini Kit	Invitex	10403002
SsoFast TM EvaGreen Supermix	Bio-Rad	172-5200

4.1.3 Chemikalien

Für diese Arbeit wurden die gängigen Chemikalien über die Firmen Roth, Merck, Sigma Aldrich, GE Healthcare, Invitrogen und Oxoid bezogen. Besondere Chemikalien sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Tabelle 4.4: Alphabetische Auflistung verwendeter Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller	Typ
Alamar Blue	Biozol	BZL 00726
Anisaldehyd 98 %	Sigma	A8, 810-7
Elektrophorese Gel 40 (29:1)	Roth	A515.1
Ficoll-Paque TM Plus	GE Healthcare	17-1440-02
Histopaque 11191	Sigma	11191
Ninhydrin-Sprühlösung	Merck	106705
Paraformaldehyde Solution 16 %	Electron Microscopy Sciences	15710-S
SYTOX Green Nucleic Acid Stain	Molecular Probes	S-7020
Trypan blau	Sigma	T8154

4.1.4 Antibiotika und Medienzusätze

Die in dieser Arbeit verwendeten Medienzusätze sind in Tabelle 4.5 aufgelistet. Die Stammlösungen in ddH_2O wurden durch 0,22 μm Sterilfilter (Millipore) steril filtriert und dem autoklavierten, auf ($< 50\text{ }^\circ\text{C}$) abgekühltem Medium zugefügt.

Tabelle 4.5: Alphabetische Auflistung verwendeter Antibiotika und Medienzusätze.

Antibiotika	Hersteller	Stocklösung	Lagerung
Blasticidin-S	Fluka	25 mg/mL in ddH_2O	-20 $^\circ\text{C}$
Chloramphenicol	Fluka	40 mg/mL in 96 % Ethanol	-20 $^\circ\text{C}$
Gentamicin	PAA	50 mg/mL in ddH_2O	4 $^\circ\text{C}$
G418 Disulfat	Sigma	20 mg/mL in ddH_2O	-20 $^\circ\text{C}$
Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid (IPTG)	Sigma	1 M in ddH_2O	-20 $^\circ\text{C}$
Kanamycin	Fluka	40 mg/mL in ddH_2O	-20 $^\circ\text{C}$
Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF), recombinant human	R&D SYSTEMS	10 $\mu\text{g/mL}$ in 1xPBS mit 0,1 % FCS	-20 $^\circ\text{C}$
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma	10 mmol in Ethanol	-20 $^\circ\text{C}$
Streptomycin	Sigma	50 mg/mL in ddH_2O	-20 $^\circ\text{C}$

4.1.5 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4.6 aufgelistet.

Tabelle 4.6: Alphabetische Auflistung verwendeter Primär- und Sekundärantikörper.

Abkürzung	Antikörper	Referenz / Hersteller
Sekundärantikörper		
Alexa 488 anti-rabbit	Alexa 488-conjugated goat-anti-rabbit IgG	A-11034, Invitrogen
Alexa 488 anti-mouse	Alexa 488-conjugated goat-anti-mouse IgG	A-11001, Invitrogen
Alexa 568 anti-rat	Alexa 568-conjugated goat-anti-rat IgG	A-11077, Invitrogen
Cy3 anti-mouse	Cy3-conjugated goat-anti-mouse IgG	115-165-003, Dianova
Primärantikörper		
Gm-AK	Rabbit-anti-Gentamicin Antikörper (polyklonal)	ABIN 351820, Antikörper-online
Lp-AK	Rabbit-anti- <i>L. pneumophila</i> Sg 1-12 (polyklonal)	ABIN 237744, Antikörper-online,
VatA-AK	mAb 221-35-2 (mouse-anti-VatA <i>D. discoideum</i>)	Maniak 2010
HA-AK	mAb 3F10 (mouse-anti-HA-tag)	Roche Diagnostics
Immunserum	Patientenserum (human / Lp1 MAbtyp Allentown France, Mab3-1 positiv)	C. Lück, 2010

4.1.6 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 4.7 aufgelistet.

Tabelle 4.7: Alphabetische Auflistung verwendeter Bakterienstämme.

Stamm	Charakteristika	Kultivierung	Referenz
<i>Acinetobacter spec.</i> ADP1		37 °C, LB	Genoscope, Frankreich
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58		25 °C, LB	Gene Nester, USA
<i>Bacillus megaterium</i>		37 °C, LB	DSM-319, DSMZ
<i>Burkholderia cepacia</i> LC 21-3b	Isolat aus der Kartoffelknolle	37 °C, LB	G. Berg, Universität Rostock
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. Atroseptica SCRI1043		25 °C, LB	I. Toth, UK
<i>Escherichia coli</i> dH5α-GFP	<i>E. coli</i> dH5α transformiert mit pRK10 (pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip})	37 °C, LB, Cm ^R	Köhler Diss., 2000
<i>Escherichia coli</i> HB101	Nicht-invasiver K-12-Stamm	37 °C, LB	Boyer & Roullant-Dussoix, 1969
<i>Klebsiella aerogenes</i>		37 °C, LB	M. Schleicher, LMU München
<i>Legionella anisa</i>		37 °C, BCYE	B.S Fields <i>et al.</i> , 1990
<i>Legionella bozemanii</i>		37 °C, BCYE	ATCC 33217
<i>Legionella dumoffii</i>		37 °C, BCYE	ATCC 33279
<i>Legionella feeleyi</i>		37 °C, BCYE	ATCC 35072
<i>Legionella gormanii</i>		37 °C, BCYE	ATCC 33297
<i>Legionella hackeliae</i> SG1		37 °C, BCYE	ATCC 33250
<i>Legionella israelensis</i>		37 °C, BCYE	ATCC 43119
<i>Legionella jordanis</i>		37 °C, BCYE	ATCC 33623
<i>Legionella longbeachae</i> SG1		37 °C, BCYE	ATCC 33462
<i>Legionella lytica</i>		30 °C, LB	Drozansky, Lublin
<i>Legionella pneumophila</i> Corby	Patientenisolat, hochvirulent	37 °C, BCYE	Jepras <i>et al.</i> , 1985
<i>Legionella pneumophila</i> Corby mcherry	<i>L. pneumophila</i> Corby transformiert mit pXDC50 (mcherry)	37 °C, BCYE, Cm ^R , IPTG	Diese Arbeit
<i>Legionella pneumophila</i> Corby-GFP	<i>L. pneumophila</i> Corby transformiert mit pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip})	37 °C, BCYE, Cm ^R , Km ^R , Rif ^R	Köhler Diss., 2000
<i>Legionella pneumophila</i> Phil. I JR32 LELA3118 (Δ <i>dotA</i>)	<i>dotA</i> -Deletionsmutante, <i>dotA</i> 3118:Tn903DLL <i>LacZ</i>	37 °C, BCYE, Km ^R	Ko <i>et al.</i> , 2003
<i>Legionella pneumophila</i> Phil. I JR32 LELA3118 mcherry (Δ <i>dotA</i>)	<i>dotA</i> -Deletionsmutante <i>dotA</i> 3118:Tn903DLL <i>LacZ</i> transformiert mit pXDC50 (mcherry)	37 °C, BCYE, Km ^R , Cm ^R , IPTG	Diese Arbeit Charpentier (Plasmid)
<i>Legionella pneumophila</i> Phil.1 JR32-2 (Δ <i>mip</i>)	<i>mip</i> -Deletionsmutante,	37 °C, BCYE, Sm ^R , Km ^R	Wintermeyer <i>et al.</i> , 1995

Stamm	Charakteristika	Kultivierung	Referenz
<i>Legionella pneumophila</i> Phil.I JR32	Restriktionsdefizientes Derivat	37 °C, BCYE, Sm ^R	Marra & Shumann, 1989
<i>Legionella. hackeliae</i> SG1 mcherry	<i>L. hackeliae</i> SG1 transformiert mit PXDC50 (mcherry)	37 °C, BCYE Cm ^R , IPTG	G. Günther, 2011, Charpentier (Plasmid)
<i>Legionella micdadei</i>		37 °C, BCYE	ATCC 33218
<i>Listeria monocytogenes</i>	Patientenisolat	37 °C, Blutagar	S. Bergmann, TU Braunschweig
<i>Mycobacterium avium</i>		37 °C, 7H11	DSMZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1		37 °C, LB	Dunn & Holloway, 1971
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP 134		30 °C, LB	B. González, Chile
<i>Salmonella enterocolitica</i>		37 °C, LB	S. Bergmann, TU Braunschweig
<i>Staphylococcus aureus</i>		37 °C, LB	NCTC 8325
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Serotyp 2 D39	stark bekapselter Wildtyp, Maus virulent	37 °C, THY, Blutagar	O. T. Avery <i>et al.</i> , 1944
<i>Xanthomonas campestris</i> vesicatoria strain 85-10		25 °C, LB	U. Bonas, Halle
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> YPIII		25 °C, LB	Bolin <i>et al.</i> , 1982

Ap^R (Ampicillinresistenz), Km^R (Kanamycinresistenz), Sm^R (Streptomycinresistenz), Cm^R (Chloramphenicolresistenz), Tc^R (Tetracyclinresistenz), Rif^R (Rifampicinresistenz)

4.1.7 Eukaryotische Zellen und Zell-Linien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen und Zell-Linien sind in Tabelle 4.8 aufgelistet.

Tabelle 4.8: Alphabetische Auflistung verwendeter Zellen und Zell-Linien.

Zell-Linie	Charakteristika	Kultivierung	Referenz
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2		21 °C, HL5	Dr. Eichinger, Prof. Noegel, Universität zu Köln
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 ($\Delta atg9$)	Autophagy related protein 9-Deletionsmutante von <i>D.d.</i> AX2, gestörte Sporenbildung	21 °C, HL5	Dr. Eichinger, Universität zu Köln
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2- <i>atg9</i> ⁻ / <i>cdcD</i> _R155C-RFP (<i>atg9</i> / <i>cdcD</i>)	Autophagy related protein 9-Deletionsmutante von <i>D.d.</i> AX2, mit Punktmutation im Gen <i>cdcD</i> an Position R155C, exprimiert RFP, gestörte Sporenbildung	21 °C, HL5, G418 ^R (20 µg/mL)	Dr. Eichinger, Universität zu Köln
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 (<i>rpkA</i>)	<i>rpkA</i> -Deletionsmutante von <i>D.d.</i> AX2, gestörte Sporenbildung	21 °C, HL5, G418 ^R (10 µg/mL) Wächst nicht in Schüttelkultur	Prof. Noegel, Universität zu Köln
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 (<i>rpkA</i>) RpkAfl-HA (1D9)	<i>D.d.</i> AX2 <i>rpkA</i> ⁻ komplementiert mit RpkAfl-HA (HA-Tag C-terminal)	21 °C, HL5, G418 ^R (3-4 µg/mL), Bla ^R (20 µg/mL)	Prof. Noegel, Universität zu Köln
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2 (<i>rpkA</i>) RpkAfl-HA (1E7)	<i>D.d.</i> AX2 <i>rpkA</i> ⁻ komplementiert mit RpkAfl-HA (HA-Tag C-terminal)	21 °C, HL5, G418 ^R (3-4 µg/mL), Bla ^R (20 µg/mL)	Prof. Noegel, Universität zu Köln
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2- <i>atg</i> ⁻ _GFP-ATG9 (AGA5)	<i>D.d.</i> AX2 <i>atg</i> ⁻ komplementiert mit einer GFP-ATG9 Fusion (10-fach überexprimiert, N-terminal)	21 °C, HL5, Sm ^R (40 µg/mL), Bla ^R (3-5 µg/mL)	Dr. Eichinger, Universität zu Köln
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2- <i>atg9</i> ⁻ _ATG9-GFP (AAG1)	<i>D.d.</i> AX2 <i>atg</i> ⁻ komplementiert mit einer ATG9-GFP-Fusion (10-fach überexprimiert, C-terminal)	21 °C, HL5, Sm ^R (40 µg/mL), Bla ^R (3-5 µg/mL)	Dr. Eichinger, Universität zu Köln
Lungenepithel-Zell-Linie NCI-H292	Epithelzellen aus humanem mukoepidermoiden Lungenkarzinom	RPMI 1640, 2 mM L-Glutamine, 10% FCS, 37 °C, 5 % CO ₂	ATCC CRL-1848™
Makrophagen-Zell-Linie U937	Humane leukämische Monozyten Lymphom-Zell-Linie	RPMI 1640, 2 mM L-Glutamine, 10% FCS, 37 °C, 5 % CO ₂	DSMZ, ACC 5

Bla^R (Blasticidinresistenz), Sm^R (Streptomycinresistenz), G418^R (G418-Resistenz)

4.1.8 Gräser, Pilze und Algen

Die in dieser Arbeit verwendeten Gräser, Algen und Pilzstämme sind nachfolgender Tabelle 4.9 aufgelistet.

Tabelle 4.9: Alphabetische Auflistung verwendeter Gräser, Algen und Pilzstämme.

Stamm	Kultivierung	Referenz
<i>Agrostis stolonifera</i>	Gamborg's B5, 20 °C	B. Schulz, TU Braunschweig
<i>Botrytis cinerea</i>	KM, RT	B. Schulz, TU Braunschweig
<i>Chlorella fusca</i>	CP, 20 °C	B. Schulz, TU Braunschweig
<i>Cryptococcus neoformans</i>	LB, 37 °C	K. Lengeler, Düsseldorf
<i>Pythium debaryanum</i>	KM, RT	B. Schulz, TU Braunschweig
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LB, RT	B. Schulz, TU Braunschweig
<i>Thanatephorus cucumeris</i> (teleomorph)/ <i>Rhizoctonia solani</i> (anamorph)	KM, RT	B. Schulz, TU Braunschweig
<i>Microbotryum violaceum</i>	KM, RT	B. Schulz, TU Braunschweig

4.2 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Für die Kultivierung von Bakterien wurden flüssige sowie feste Medien standardmäßig durch Autoklavieren (121 °C, 15 min) sterilisiert.

4.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der verwendeten *Legionella*-Stämme erfolgte auf „Buffered Charcoal Yeast Extract“-Agarplatten (BCYE) bei 5 % CO₂ und bei der in Tabelle 4.7 angegebenen Temperatur für drei Tage (bzw. 5 Tage bei *L. lytica*) bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase. Von diesen Kulturen wurden Flüssigkulturen in „Yeast Extract Broth“-Flüssigmedium (YEB) angelegt und bei 200 rpm bis zur stationären Phase (OD₆₀₀ = 3,6-4,2) kultiviert.

Die Zelldichte in Flüssigkulturen wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte gegen eine Referenz bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Ab einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde eine 1:10 Verdünnung der Kultur eingestellt. Nach folgender Formel erfolgte die Umrechnung der gemessenen OD₆₀₀ in colony forming units pro Milliliter (cfu/mL):

$$y = 0,1114x^2 + 0,5448x + 0,0813$$

Hierbei entspricht x dem gemessenen OD₆₀₀-Wert und y der Zelldichte in cfu/mL. Bei *Legionella*-Kulturen wurde darauf geachtet, dass die gemessene OD₆₀₀ der Bakteriensuspension zwischen 0,1-0,5 lag.

BCYE-Agar für die Anzucht von *Legionella*

Aces 5 g
Hefeextrakt 10 g
In 1000 mL MiliQ lösen, pH mit 10 N KOH auf 6,9 einstellen

Aktivkohle 2 g
Agar 15 g
Zugeben und autoklavieren

Medium auf ca. 40 °C abkühlen lassen

L-Cystein 0,40 g in 10 mL MiliQ

Fe(III)NO₃×9H₂O 0,25 g in 10 mL MiliQ

Sterilfiltrieren und getrennt voneinander vor dem Gießen der Platten zugeben

„Yeast Extract Broth“-Flüssigmedium (YEB) zu Kultivierung von *Legionella*

ACES 10 g
Hefeextrakt 10 g
In 900 mL MiliQ lösen, pH mit 10 N KOH auf 6,9 einstellen, auf 1000 mL auffüllen

L-Cystein 0,40 g in 10 mL MiliQ

Eisenpyrophosphat 0,25 g in 10 mL MiliQ

Lösungen getrennt voneinander zum Medium geben, durch einen „SteriTop-Filter“ (0,22 µM) in eine autoklavierte Schottflasche sterilfiltrieren

L. monocytogenes und Streptokokken wurden auf Blutagarplatten (BD Columbia Agar mit 5 % Schafsblut) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für die Anzucht in Flüssigkultur wurden Streptokokken mit Hilfe einer Impföse von einer gut bewachsenen Platte (ü.N.-Kultur) in 1 mL THY-Medium resuspendiert und in ein 50 mL Röhrchen mit 20 mL THY-Medium überführt (OD₆₀₀ = 0,1). Die Bakterien wurden stehend bis zur gewünschten Dichte (maximal OD₆₀₀ = 0,4) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei Pneumokokken entspricht eine OD₆₀₀ = 0,1 einer Zellzahl von 1×10⁸/mL. Die Kultur aller übrigen in Tabelle 4.7 aufgeführten Bakterien erfolgte auf LB-Agar bzw. in LB-Medium bei entsprechender Temperatur.

Todd-Hewitt Broth Medium mit Yeast Extract (THY)

Bacto™ Todd-Hewitt Broth Basispulver (BD)	30	g
Hefeextrakt (BD)	10	g
In 1000 mL dH ₂ O lösen, autoklavieren		

LB-Medium

Caseinpepton	10	g
Hefeextrakt	5	g
Natriumchlorid	5	g
In 1000 mL dH ₂ O lösen, autoklavieren		

Zur Herstellung fester Medien wurden 15 g Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

4.2.2 Konservierung von Bakterien

Für die längerfristige Lagerung von *Legionella* wurden 1,2 mL Bakteriensuspension in 1 x PBS von einer 3 Tage alten *Legionella*-Platte hergestellt, mit 600 µL 86%igem Glycerin versetzt und in Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren. Entsprechend wurde mit Übernachtskulturen der übrigen Bakterienstämme verfahren.

4.3 Extraktionsmethoden zur Gewinnung von Reinsubstanzen aus *Bacillus pumilus***Kultivierung von *Bacillus pumilus***

Die Anzucht von *B. pumilus* erfolgte auf BCYE-Agar bei 37 °C und 5 % CO₂. Flüssigkulturen wurden aus einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft und in YEB-Medium oder im Vollmedium Luria Bertani (LB) über Nacht (ü.N.) bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Die Gewinnung sowie Charakterisierung des *B. pumilus*-Rohextraktes erfolgten in 1 Liter-Maßstab mittels Agarextraktion bzw. Flüssigextraktion. Da zur Strukturaufklärung einzelner Extraktbestandteile große Mengen Flüssigkultur benötigt werden, erfolgte in Kooperation mit Prof. H. Laatsch (Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August Universität Göttingen) die Anzucht im Fermenter (50 L) sowie als Schüttelkultur (30 L) in LB Medium.

Agarextraktion

Die Gewinnung von kleinen Mengen Rohextrakt aus *B. pumilus*-Kulturen erfolgte über Agarextraktion oder Flüssigextraktion mit Ethylacetat (EtOAc). Durch Verwendung unterschiedlicher Kulturbedingungen (fest / flüssig; mit und ohne Schikane; LB / BCYE bzw. YEB; Zeit) und anschließende Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) der Extrakte für *Legionella* konnten optimale Kulturbedingungen zur Produktion des Hemmstoffes etabliert werden.

Für die Agararextraktion wurden 30 BCYE- oder LB-Platten mit *B. pumilus* beimpft und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Jeweils 15 bewachsene Platten wurden mit 250 mL ddH_2O in einen Küchenmixer überführt, für eine Minute auf Stufe drei und weitere 30 Sekunden auf Stufe eins bis zwei homogenisiert. Falls notwendig wurde Wasser bis knapp unter die $\frac{3}{4}$ Liter Marke zugefügt. Die Masse wurde anschließend durch einen Pulvertrichter in eine 1 L Flasche mit intaktem Dichtungsring gegeben und danach 300 mL EtOAc zu ca. 700 mL Homogenisat zugefügt. Die Flasche wurde 5 min kräftig geschüttelt und bis zur Phasentrennung stehen gelassen. Die obere organische Phase wurde durch einen Faltenfilter in einen sauberen Rundkolben überführt. Das Ausschütteln der Agarmasse mit EtOAc erfolgte insgesamt dreimal. Anschließend wurde die EtOAc-Phase im Rotationsverdampfer eingeeengt und die verbleibende Flüssigkeit unter dem Abzug verdampft. Der erhaltene Extrakt wurde in Methanol (MeOH) gelöst, mit einer Glaspasteurpipette in ein ausgewogenes Glasgefäß überführt und das Trockengewicht bestimmt. Für weitere Tests wurde der Extrakt auf die gewünschte Konzentration (10 mg/mL, 20 mg/mL oder 40 mg/mL) in MeOH eingestellt und bei 4 °C aufbewahrt.

Flüssigextraktion

Zur Gewinnung von Rohextrakt durch Flüssigextraktion wurden 1 L-Kulturen von *B. pumilus* in YEB- bzw. LB-Medium über 24-48 h bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in 1 L-Kolben mit oder ohne Schikane zu je 500 mL. Durch Zentrifugation (30 min, 3000 x g, 4 °C) wurden die Bakterien vom Kulturüberstand getrennt. Dies ermöglichte eine getrennte Aufarbeitung von Zellsediment und Kulturüberstand sowie die separate Analyse und

Zuordnung der antibakteriellen Wirkung auf *Legionella*. Der Kulturüberstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und mit in einem Scheidetrichter viermal mit EtOAc ausgeschüttelt. Hierfür wurden je 300 mL, 200 mL, 100 mL und 100 mL EtOAc zum einem Liter Überstand hinzugegeben und für 5 min geschüttelt. Um die Bildung einer Mischphase zu verhindern durfte nicht zu stark und zu lange geschüttelt werden. Bildete sich dennoch eine Mischphase aus, wurde noch etwas EtOAc oder eine kleine Spatelspitze Natriumchlorid hinzugefügt. Nach erfolgter Phasentrennung (wässrige Phase unten, EtOAc oben), konnte die EtOAc-Phase in einen Rundkolben abgelassen und am Rotationsverdampfer eingeeengt werden.

Das Zellsediment wurde mit MilliQ-Wasser aus den Zentrifugenbechern gelöst, in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (10 min, 5000 x g, 4 °C). Der wässrige Überstand wurde dekantiert und das Zellsediment bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen aufgetaut, in MeOH resuspendiert und 15 min mit Ultraschall behandelt um den Zellaufschluss zu fördern. Nach Zentrifugation (10 min, 5000 x g, 4 °C) wurde der Überstand in einen Rundkolben überführt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Zellsediment wurde insgesamt dreimal mit MeOH und zweimal mit Aceton extrahiert. MeOH und Aceton-Extrakt wurden getrennt voneinander am Rotationsverdampfer eingeeengt und verbleibende Flüssigkeit unter dem Abzug verdampft. Die Extrakte wurden in MeOH gelöst und in ausgewogene Glasgefäße sterilfiltriert (0,2 µM). Dies war nötig, um ein Auskeimen der Bacillussporen zu verhindern. Wie für die Agarextraktion beschrieben wurden die Extrakte auf eine gewünschte Konzentration (10 mg/mL bzw. 20 mg/mL) in MeOH eingestellt und bei 4 °C aufbewahrt.

Fermentation und Extraktbearbeitung

Die Isolation und Strukturaufklärung von biologisch aktiven Substanzen aus *B. pumilus*-Kulturen erforderte die Bereitstellung großer Mengen an Rohextrakt. Hierfür wurden in Kooperation mit Prof. Laatsch (Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Göttingen) 50 L- und 30 L-Kulturen in LB-Medium angesetzt. Zum Beschicken des 50 L-Fermenters wurden zunächst 15 Erlenmeyerkolben à 300 mL LB-Medium mit *B. pumilus* beimpft und ü.N. bei

28 °C auf einem linearen Schüttler kultiviert. Der Fermenter wurde mit 45 L LB-Medium befüllt und autoklaviert. Die Fermentation erfolgte nach Zugabe von 5 L Vorkultur für 24 h bei 35 °C, 200 rpm, einer Belüftungsrate von 20 L/min und pH $6,5 \pm 1,5$. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von ca. 1,4 L 2 N NaOH und 1,5 L Zitronensäure reguliert und die Schaumbildung durch Einsatz von ca. 0,5 L Niax (Polypropylenglykol) limitiert. Zusätzlich zur Fermentation wurde eine 30 L-Kultur in Erlenmeyerkolben à 300 mL auf einem linearen Schüttler bei 28 °C für 24 h kultiviert. Vor der Extraktion der *B. pumilus*-Kultur wurde deren Reinheit durch Ausstriche von Vor- und Hauptkulturen auf BCYE-Agar überprüft.

Die Kulturen wurden zunächst geerntet, mit Celite (Kieselgur) versehen und unter Vakuum durch eine Filterpresse gegeben. Feste Kulturbestandteile verblieben mit Celite in der Filterpresse und das Filtrat wurde in einem sauberen Gefäß aufgefangen. Anschließend folgte die getrennte Aufarbeitung der Zellmasse und des Filtrats.

Chemische Aufarbeitung des Zellsediments

Die Zellmasse wurde mit Ultraschall behandelt und dreimal mit EtOAc sowie mit Aceton extrahiert. Beide Extrakte wurden im Rotationsverdampfer eingeeengt und schließlich zu einer Fraktion vereinigt. Die folgende Aufarbeitung sowie die Strukturaufklärung einzelner Extraktbestandteile führte H. Wang (Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August Universität Göttingen) durch (Wang, 2012). Der gewonnene Rohextrakt wurde mittels Cyclohexan entfettet und über eine Silicagel-Säule und einen $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ Gradienten (100 % CH_2Cl_2 bis 100 % MeOH) fraktioniert. Die weitere Trennung der Einzelfractionen erfolgte mittels RP-HPLC über einen MeOH-Gradienten (20 % MeOH/ H_2O bis 100 % MeOH). Nach Durchführung einer präparativen Dünnschichtchromatographie in 20 % MeOH/ CH_2Cl_2 wurden unterschiedliche Banden ausgekratzt und mit MeOH eluiert. Anschließend wurde die Minimale Hemmkonzentration (MHK) der Fraktionen gegenüber *L. pneumophila* Corby, *E. coli* und *B. megaterium* bestimmt (s. Abschnitt 4.4.3). Bei Fraktionen mit inhibitorischer Wirkung auf *L. pneumophila* Corby erfolgte die Strukturaufklärung der Substanz über 2D NMR und HPLC-ESI-MS/MS.

Chemische Aufarbeitung der Kulturüberstände

Der Kulturüberstand wurde auf eine XAD 16-Säule gegeben, mit MeOH eluiert und in einem Rotationsverdampfer eingedunstet. Die weitere chemische Aufarbeitung des Rohextrakts führte H. Wang (Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August Universität Göttingen) durch (Wang, 2012). Alle erhaltenen Fraktionen wurden auf antibakterielle Aktivität gegenüber *Legionella* (MHK-Bestimmung) und mittels Chlorine / *o*-Dianisidin-Reaktion auf das Vorhandensein von Peptiden getestet. Nur aktive Fraktionen wurden für weitere Aufarbeitungsschritte eingesetzt. Zunächst erfolgte die Entfettung des Rohextrakts über Cyclohexan. Die entfettete Fraktion wurde mittels RP-HPLC (Diolphase) über einen MeOH/H₂O-Gradienten aufgetrennt. Aktive Peptidfraktionen wurden durch Größenausschlusschromatographie über Sephadex LH-20 Säulen mit MeOH/CH₂Cl₂ (1:2) weiter aufgetrennt. Die Durchführung einer präparativen HPLC unter Verwendung einer analytischen RP C4 Säule ermöglichte die Trennung der hierdurch erhaltenen, aktiven Peptidfraktion in vier einzelne Peptidfraktionen mit den Massen 1035, 1049, 1063 bzw. 1077 sowie hoher Aktivität gegenüber *L. pneumophila* Corby. Die Strukturaufklärung der Peptide erfolgte mittels HPLC-MS/MS und 2D NMR.

4.4 Charakterisierung von *B. pumilus* DKS1 Rohextrakt

Zur Charakterisierung der aus *B. pumilus*-Kulturen gewonnenen Rohextrakte wurden Dünnschichtchromatographie und verschiedene chemische sowie biologische Tests durchgeführt.

4.4.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie stellt ein verbreitetes Verfahren zur Auftrennung und Darstellung von Stoffgemischen dar. Die Substanzen werden mit Hilfe der mobilen Lösungsmittelphase (hier 10 % MeOH in CH₂Cl₂) über Kapillarkräfte am stationären Trägermaterial (DC Kieselgel 60 F254) entlanggeführt. Das Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Wechselwirkung der einzelnen Stoffe mit der mobilen und der stationären Phase. Wenn die Substanz z.B. eine höhere Affinität zum Lösungsmittel hat, wird sie näher zur

Lösungsmittelfront eluiert. Standardmäßig wurden 10 µL Rohextrakt (20 mg/mL) punktförmig 1 cm über dem unteren Plattenrand auf eine DC-Platte aufgetragen. Eine schnellere Verflüchtigung des Lösungsmittels wurde durch Verwendung einer ca. 40 °C warmen Heizplatte erreicht. Die Platte wurde in eine mit 10 % MeOH in CH₂Cl₂ gesättigte Kammer gestellt. Der Boden der Kammer war ca. 1 cm mit Lösungsmittel bedeckt. Hatte die Laufrfront die Hälfte der Platte erreicht, wurde diese zum Trocknen unter den Abzug gelegt und anschließend erneut in die Kammer gestellt. Sobald die Laufmittelfront 1 cm unter dem oberen Plattenrand war, wurde die DC entnommen, die Laufmittelfront mit einem Bleistift markiert und die Platte unter dem Abzug für weitere Analysen aufbewahrt. Die qualitative Auswertung der Banden erfolgte über die Bestimmung des R_F-Wertes, welcher ein Maß für die Wanderungsgeschwindigkeit einer bestimmten Substanz in einem definierten Lösungsmittel darstellt. Der R_F-Wert berechnet sich aus dem Quotienten der Laufstrecke der Substanz (Startlinie bis Substanzfleck) und der Laufstrecke des Lösungsmittels (Startlinie bis Lösungsmittelfront).

Auswertung der Dünnschichtchromatographie

Um einen ersten Überblick über die Anzahl unterschiedlicher Stoffe im Rohextrakt zu bekommen wurde zum einen die Detektion über UV-Licht als Methode verwendet. Zum anderen wurden mit gleichen Extraktmengen und Lösungsmitteln beschickte DC-Platten mit unterschiedlichen Reagenzien gefärbt.

UV-Licht Detektion

Die DC-Platten wurden unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm ausgewertet. Aromatische Verbindungen sowie Stoffe mit vielen funktionellen oder konjugierten Gruppen werden hierdurch sichtbar. Bei einer Wellenlänge von 254 nm wird der im Kieselgel enthaltene Fluoreszenzindikator F254 zu grüner Fluoreszenz angeregt. Dadurch erscheint die Kieselgelplatte grün. Substanzen, welche diese Wellenlänge absorbieren, können als dunkler Fleck auf der DC-Platte detektiert werden (Fluoreszenzlöschung). Substanzen, die eine

Eigenfluoreszenz besitzen werden hingegen mit der Wellenlänge 366 nm angeregt und emittieren leuchtend farbiges Licht.

Chlorine / *o*-Dianisidin-Reaktion

Die Chlorine / *o*-Dianisidin-Reaktion wird universell zum Nachweis von Peptiden eingesetzt. Hierzu wurde eine kleine Spatelspitze Kaliumpermanganat in ein Glasröhrchen gegeben und mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt. Das Glasröhrchen wurde zusammen mit der DC-Platte in eine große Glaspetrischale gelegt und der Petrischalen-Deckel aufgelegt. Die DC-Platte wurde nun mindestens 30 min in der entstehenden Chlorgasatmosphäre inkubiert und anschließend für 1 h belüftet um das restliche Chlorgas zu entfernen. Für die Färbung wurde die vorbereitete DC-Platte mit der fertigen Dianisidin-Lösung (farblose Lösung) besprüht. Peptide färben sich sofort grünlich-blau. Als Positivkontrolle wurde Speichel benutzt.

Chlorine / *o*-Dianisidin-Lösung

Dianisidin-Lösung	100	mL in 0,032 % in 1 N Essigsäure
Na ₂ WO ₄ x 2H ₂ O	1,5	g in 10 mL H ₂ O
Aceton	115	mL
KI	450	Mg

Reagenz durch einen Faltenfilter geben, um den Niederschlag zu entfernen.

Ninhydrin-Färbung

Die Verwendung von Ninhydrin ermöglicht den Nachweis von Aminosäuren und kurzkettigen Peptiden. Ninhydrin reagiert mit freien Aminogruppen und bildet einen violetten Farbstoff. Zyklische Peptide werden nicht angefärbt. Die DC-Platten wurden mit Ninhydrin-Lösung (Merck) besprüht und einige Minuten bei 100 °C inkubiert.

Anisaldehydfärbung

Anisaldehyd färbt speziell Kohlenhydrate (gelb bis braun), Öle (dunkel- violett), Glykoside (rot bis blau) an. Peptide werden nicht detektiert. Das Reagenz wurde aus 85 mL MeOH, 14 mL Eisessig, 1 mL konzentrierter Schwefelsäure und 1 mL Anisaldehyd hergestellt und bei 4 °C gelagert. Die DC-Platte wurde mit dem Reagenz besprüht und anschließend ca. 5 min bei 130 °C erhitzt.

4.4.2 Temperatur- und pH-Stabilität

Die Bestimmung der Temperaturstabilität diente zur weiteren Charakterisierung der *B. pumilus*-Extrakte. Der Extrakt wurde in Glasgefäßen getrocknet und für 120 min bei 50 °C sowie 90 °C im Wasserbad inkubiert oder bei 120 °C und 15 min autoklaviert. Die Extrakte wurden auf 10 mg/mL mit MeOH eingestellt und die minimale Hemmkonzentration (MHK) von *Legionella* bestimmt.

Durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure bzw. Natronlauge für mindestens 18 h bei RT konnte die Sensitivität gegenüber alkalischem oder saurem pH-Wert ermittelt werden. Hierfür wurde der Extrakt in MeOH gelöst und 1:1 mit Säure oder Lauge versetzt. Anschließend wurden die Extrakte erneut getrocknet, mit MeOH auf 10 mg/mL eingestellt und zur Bestimmung der MHK von *Legionella* eingesetzt. Es wurden Kontrollen mit der entsprechenden Menge an HCL bzw. NaOH mitgeführt.

4.4.3 Biologisches Screening von Extrakten

Zur Einschätzung der biologischen Aktivität der Rohextrakte wurden diese auf antibakterielle, algizide, fungizide und herbizide Wirkung untersucht. Dies erfolgte über Plättchentests bzw. durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration in Flüssigkultur. Die zytotoxische Wirkung auf humane Zellen wurde mittels Alamar blue Assay bestimmt.

Agardiffusionstest (Plättchentest)

Bakterien wurden hierfür auf entsprechenden Agarplatten (siehe Tabelle 4.7) ausgestrichen und Antibiotika-Testplättchen (Machery & Nagel, d = 9 mm) aufgelegt. Pro Testplättchen wurden je 40 µL Extrakt (Ausgangskonzentration 20 mg/mL) aufgetropft und entsprechende Lösungsmittelkontrollen mitgeführt. Es folgte eine Inkubation der Platten für 1-7 Tage unter den stammspezifischen Kulturbedingungen. Für die Auswertung wurden die Hemmhöfe ausgehend von der Mitte des Plättchens bis zum Rand des Hemmhofs vermessen.

Die Algizität von Extrakten wurde mit Hilfe der einzelligen Grünalge *Chlorella fusca* bestimmt. Testplättchen wurden auf CP-Agar gelegt und 40 µL Extrakt

(Ausgangskonzentration 20 mg/mL) aufgetropft. Anschließend wurden die Platten mit einer steril beimpften wässrigen *Chlorella*-Lösung besprüht und bei 20 °C, 10 h Licht (1000 x 10 Lux) für 1 Woche kultiviert.

CP-Platten

Hefeextrakt	10 g
D(+)-Glucose	10 g
Agar	15 g

In 1000 mL dH_2O lösen, pH auf 6,2 einstellen, autoklavieren

Durch Plättchentests mit den Pilzen *Botrytis cinerea*, *Ustilago maydis*, *Pythium debaryanum* und *Thanatephorus cucumeris* sollte geprüft werden, ob sich Hinweise auf eine fungizide Wirkung der Extrakte finden lassen. Die Kultivierung erfolgte für 1-2 Wochen auf Kartoffel-Möhre-Agar (KM) bei RT analog zur Beimpfung mit *Chlorella*.

Kartoffel-Möhre-Agar (KM)

Kartoffeln	500 g
Möhren	500 g
dH_2O	1500 mL

Die Kartoffeln wurden geschält, in kleine Stücke geschnitten und mit den Möhren in 1,5 L Wasser 2 h gekocht. Anschließend wurde das verdunstete Wasser aufgefüllt, die Masse püriert und in 100 mL Portionen bei -20 °C eingefroren. Zur Herstellung von 1 L KM-Agar wurden 100 mL KM- Medium mit 15 g Agar sowie 900 mL dH_2O autoklaviert.

Der Keimungstest von *Agrostis stolonifera* ermöglichte den Test auf die herbizide Wirkung der Extrakte. In einer Multiwellplatte (96 Well, Greiner bio-one) wurden je 30 Samen pro Well mit 250 μL Gamborg's B-5 Lösung (Sigma) und 9 μL des jeweiligen Extraktes versehen. Die Platten wurden in einer feuchten Kammer bei 20 °C und 10 h Licht (1000 x 10 Lux) inkubiert. Nach ca. zwei Wochen konnte die Keimungsrate bestimmt werden.

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) von Extrakten erfolgte als Doppelbestimmung in 96-Wellplatten (92696, TPP). Die Kulturbedingungen wurden den Bakterienstämmen entsprechend angepasst. Zunächst wurden 100 μL Medium in alle Wells vorgelegt. Die ersten Wells der Verdünnungsreihe enthielten eine definierte Menge Extrakt bzw. Testsubstanz und wurden auf 200 μL mit Medium aufgefüllt. Ausgehend von diesen Wells wurde eine Verdünnungsreihe (1:2) erstellt. Es wurden je 100 μL aus einem Well in das nächste Well überführt. Die jeweiligen Bakterienstämme wurden auf 2×10^7 Zellen/mL eingestellt und 100 μL der Suspension in jedes Well hinzu pipettiert. Für jeden Ansatz wurden entsprechende Kontrollen (nur Lösungsmittel, Medium ohne Bakterien oder Bakterien ohne Extrakt) mitgeführt. Nach erfolgter Co-Inkubation wurden Verdünnungen auf entsprechendem Nährmedium ausplattiert. Hierüber war es möglich zwischen bakteriostatischer und bakterizider Wirkung zu unterscheiden.

Bestimmung der Membranpermeabilität über SYTOX Green

SYTOX green (Molecular Probes) ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der sich an DNA eukaryotischer sowie prokaryotischer Zellen anlagert. Da der Farbstoff nur in Zellen mit beschädigter Plasmamembran eindringen kann, wird er u.a. dazu verwendet, Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Membranaktivität zu untersuchen (Roth *et al.*, 1997). Zur Bestimmung der Membranaktivität von *B. pumilus* Rohextrakt, Pumilacidin A, C, E sowie dem neuen Peptidlacton auf *L. pneumophila* wurden 6,25-100 $\mu\text{g/mL}$ Rohextrakt bzw. 3,125-25 $\mu\text{g/mL}$ der Reinsubstanzen eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden Legionellen mit 1 % Triton X-100 behandelt, welches zur Permeabilisierung der Membran führt. Zusätzlich wurden MeOH-Kontrollen mitgeführt. Legionellen einer 3 Tage alten BCYE-Agar-Kultur wurden in 1 mL 50 mM Tris/HCL pH 7,5 resuspendiert, zweimal mit 50 mM Tris/HCL pH 7,5 gewaschen ($10.000 \times g$, 3 min) und auf 4×10^8 Bakterien/mL in selbigem Puffer eingestellt. Pro Reaktionsansatz wurden 135 μL Puffer in 1,5 mL-Reaktionsgefäße vorgelegt und die entsprechende Menge Testsubstanz sowie 20 μL der Bakteriensuspension hinzugefügt. Anschließend wurde das Volumen mit Tris/HCL-Puffer auf 175 μL aufgefüllt. Die

anschließenden Schritte erfolgten im Dunkeln, da es sich bei SYTOX green um einen lichtempfindlichen Farbstoff handelt. Je 0,5 μM SYTOX green (Stammlösung 4 μM) wurde den Proben zugefügt. Diese wurden kurz gevortext und bei 37 °C, 5 % CO_2 inkubiert. Nach 24 h wurden die Proben kurz zentrifugiert und mit 800 μL 50 mM Tris/HCL pH 7,5 aufgefüllt, gemischt und in eine Küvette überführt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität für SYTOX green am Lumineszenz-Spektrometer LS 50 B (Perkin Elmer) ermittelt. Die Anregung erfolgte durch einen Scan von 490 nm, 10 nm Bandbreite und 500 nm/min. Die Fluoreszenz wird in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben. Durch 1 % Triton wurde eine RFU von 1000 erreicht.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 Transformation von *Legionella*

Zur Transformation von *Legionella* wurde eine frische *Legionella*-Kultur (3 Tage) von einer Platte abgespült und auf $\text{OD}_{600} = 1,5\text{-}2,0$ eingestellt. Von dieser Suspension wurden 100 μL auf BCYE- Agar ausplattiert und 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Die Bakterien wurden in 1 mL 10%igem, eiskalten Glycerol resuspendiert und zentrifugiert (5000 x g, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde entfernt, die Zellen vorsichtig in eiskaltem Glycerol gelöst und erneut zentrifugiert. Nach insgesamt drei Waschschritten wurden die Bakterien in eiskaltem Glycerol aufgenommen und je 50 μL davon in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Für die Elektroporation sollten immer frische Bakterien ($\text{OD}_{600} = 100$) verwendet werden. In einer eisgekühlten Elektroporationsküvette wurden 50 μL Bakteriensuspension mit 2 μL pXDC50- Plasmid-DNA (65 ng/mL) gemischt (zap bei 2,5 kV) und sofort 1 mL YEB-Medium hinzugefügt. Die Suspension wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und für 16-20 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden je 50 μL unterschiedlicher Verdünnungen des Elektroporationsansatzes auf BCYE-Agar mit 0,5 mM IPTG und 5 $\mu\text{g/mL}$ Chloramphenicol ausplattiert und drei Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Chloramphenicol dient hierbei der Selektion von positiven Klonen und IPTG wird für die Induktion der mcherry-Expression benötigt.

4.5.2 Identifizierung von Bakterien (16 S rRNA)

Die Identifizierung von Bakterien erfolgte mit Hilfe der 16S rRNA Primer 27f (GAG TTT GAT CCT GGC TCA G) und 1492r (AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC) (D. J. Lane, 1991). Für die PCR wurde eine Einzelkolonie mit einer sterilen Spitze in den PCR-Ansatz gegeben oder etwas Bakterienmaterial mit dH_2O abgespült, 5 min bei 96 °C aufgekocht, auf Eis abgekühlt, 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und 1 μ L des Überstandes in den PCR Ansatz überführt.

PCR-Ansatz

dH_2O	20	μ L
dNTP-Mix	0,5	μ L
10 x Puffer	2,5	μ L
Primer (for)	0,25	μ L
Primer (rev)	0,25	μ L
Template-DNA	1	μ L
Taq-Polymerase	0,5	μ L
Gesamtvolumen	25	μ L

PCR-Programm

94° C	2	min	} 28 Zyklen
95° C	20	s	
52° C	2	min	
72° C	2	min	
72° C	6	min	
8° C		Pause	

Nach erfolgter PCR wurden 10 μ L der DNA-Probe mit 6 x Ladepuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Zur Größenabschätzung der Amplifikate wurde ein 1 kb Größenstandard verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer für 50 min und 100 V. Anschließend wurde das Gel 15-20 min in ein Ethidiumbromidbad gegeben. Ethidiumbromid gefärbte Banden (1465 bp) konnten mittels UV-Licht detektiert werden. Die Sequenzierung der Proben wurde durch die Firma GATC durchgeführt. Hierfür wurde die erhaltene DNA mit Hilfe des QIAquick PCR purification kits (28104, Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Sequenzanalyse erfolgte abschließend mit Hilfe der NCBI-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

50 x TAE-Puffer

Tris	1,5	M
EDTA	37,5	mM
Eisessig	752	mM

6 x Ladepuffer:

Bromphenolblau	350	μ M
Xylencyanol FF	450	μ M
Glycerin (v/v)	50	%

4.5.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der DNA/RNA wurde mittels Nanodrop Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Quotient von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ ist ein Indikator für die Reinheit der DNA/RNA. Bei Werten zwischen 1,8 und 2,0 kann diese als rein betrachtet werden.

4.5.4 RNA-Isolation aus polymorphkernigen Leukozyten

In dieser Arbeit sollte die Genexpression ausgewählter Zielgene während einer *Legionella*-Infektion in humanen PMNs im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen untersucht werden. Die Isolation und Infektion wurden entsprechend den Kapiteln 4.6.4 und 4.7.2 durchgeführt. Für RNA-Arbeiten wurde grundsätzlich ein eigener Pipettensatz mit gestopften oder doppelt autoklavierten Spitzen verwendet. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass am Arbeitsplatz keine DNA-Arbeiten durchgeführt wurden. Die Aufreinigung der RNA erfolgte über den Nucleo Spin RNA II Kit (Macherey & Nagel).

Zu den Zeitpunkten 5, 10 und 20 min nach Inkubation wurde der jeweilige Infektionsansatz sowie die entsprechende Kontrolle auf Eis abgestoppt und die Suspension zentrifugiert (1500 x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in ¼ Volumen Lysispuffer der ursprünglich eingesetzten PMN-Suspension lysiert (z.B. 1,25 mL RA1 mit 12,5 μ L β -Mercaptoethanol pro $2,5 \times 10^7$ Zellen). Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mittels Injektionskanüle (0,90x120 mm 20Gx4-6/8“, Ochs Laborbedarf) konnte der Zellaufschluss optimiert werden. Das Zelllysats mit der freigesetzten RNA wurde entweder bei -80 °C eingefroren oder direkt zur RNA-Isolation eingesetzt. Diese wurde mittels Nucleo Spin RNA II Kit (Macherey &

Nagel) durchgeführt. Zunächst erfolgte die weitere Homogenisierung der Probe über „Shredder columns“. Pro $2,5 \times 10^7$ Zellen wurden zwei „Shredder columns“ verwendet. Abweichend von den Herstellerangaben wurde im Anschluss wesentlich mehr Zellmaterial ($2,5 \times 10^7$ Zellen anstelle von 5×10^6 Zellen) pro RNA-Säule eingesetzt. Hierdurch ließ sich die RNA-Ausbeute erheblich steigern. Die weitere Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Durch einen im Kit enthaltenen DNase-Verdau auf der Säule konnte genomische DNA erfolgreich aus der Probe entfernt werden. Die Elution der RNA erfolgte zunächst mit 60 μL ddH_2O , die zweite Säulenelution mit 40 μL ddH_2O . Anschließend wurden die RNA-Proben einer Probe vereinigt und mit 0,1 % 3 M Natriumacetat (pH 4,5) und 2,5 Volumen 100%igem Ethanol ü. N. bei -80°C gefällt. Die Proben wurden zentrifugiert (13.000 rpm, 15 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit je 600 μL 70%igem Ethanol (13.000 rpm, 3 min, 4°C). Die RNA wurde für 15 min bei 30°C im Thermoblock getrocknet und in 20 μL RNase-freiem ddH_2O resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte wie in Kapitel 4.5.3 beschrieben. Die erhaltene RNA wurde für weitere Analysen (Bioanalyzer, cDNA-Synthese, qRT-PCR) aliquottiert, um häufiges Auftauen zu vermeiden und bei -80°C gelagert. Aus 56 mL Vollblut konnten ca. 7×10^7 PMNs gewonnen werden. Die RNA-Ausbeute betrug zwischen 100–170 ng/ μL und war stark spenderabhängig. Alle Versuche wurden zweimal unabhängig mit Blut von einem weiblichen Spender durchgeführt.

4.5.5 RNA-Integrität

Die Integrität und Reinheit der isolierten RNA ist für weiterführende RT-PCR-Studien von großer Bedeutung. Durch Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyzers konnte die Integrität über das Verhältnis von 28 S und 18 S rRNA bestimmt werden. Der maximal erreichbare Wert beträgt zehn. Proben mit einer Integrität unter 5,6 sollten nicht mehr für RT-PCR-Studien verwendet werden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Proben mit einer Integrität ≥ 8 verwendet. Sowohl die Gelelektrophorese als auch das Elektrogramm lieferten Aussagen über die Degradation der eingesetzten RNA. Degradierete RNA wird in Form von einer Schmierbande unter- oder oberhalb der 18 S bzw. 28 S Banden sichtbar.

Verunreinigungen mit genomischer DNA können als Bande in der Probentasche detektiert werden. Alternativ zu der RNA-Analyse mittels Bioanalyzer wurden 1%ige Agarosegele zur Auftrennung der 18 S und 28 S rRNA genutzt. Hierfür wurden 3 µg RNA mit 6 x DNA-Probenpuffer gemischt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese und Visualisierung erfolgten wie in Abschnitt 4.5.2 beschrieben.

4.5.6 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die Durchführung der qRT-PCR wird RNA als Ausgangsmaterial verwendet. Diese muss zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase in komplementäre cDNA umgeschrieben werden und dient anschließend als Template für die qRT-PCR. Für die cDNA-Synthese wurde der Quantitect reverse transcription kit (Qiagen) eingesetzt und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Reaktionsansatz wurden 2 µL RNA eingesetzt. Die Konzentration der synthetisierten cDNA wurde mittels Nanodrop bestimmt und auf 100 ng/µL in ddH_2O für anschließende qRT-PCR-Studien eingestellt.

4.5.7 Primer Design

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für qRT-PCR-Studien an humanen PMNs sind in Tabelle 4.10 aufgelistet. Das Design der Primer erfolgte unter Verwendung der frei zugänglichen Software von Roche-Applied Science (www.roche-applied-science). Bei allen Primern handelt es sich um Intron-Exon-überspannende Primer. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass fertig prozessierte mRNA nur noch aus Exons besteht, die mit Hilfe der Reversen Transkriptase in komplementäre cDNA umgeschrieben werden kann. Die verwendeten Primer binden daher optimal an cDNA und nur schlecht an genomische DNA. Somit wird eine unerwünschte Amplifikation von genomischer DNA während der qRT-PCR unterbunden.

Tabelle 4.10: Oligonukleotide für qRT-PCR-Studien in humanen Zellen.

Name	T _m (°C)	Ampliconlänge (bp)	Sequenz	Quelle
EEF2	60	74	ctggagatctgcctgaagga gagacgaccgggtcagatt	Diese Arbeit
DARS	60	64	agctggatgatgctgttcg tggttaacagtagctcttcttcc	Diese Arbeit
CAT	60	60	cgcagttcggttctccac gggtcccgaactgtgtca	Diese Arbeit
SOD1	60	80	gcatcatcaattcgagcag caggccttcagtcagtcctt	Diese Arbeit
VCP	60	67	gtgtacgcctaggggatgtc tggtacggttgccgtacttc	Diese Arbeit
FttB-14-3-3 homolog	60	64	agcaggctgagcgatacg tccacatccatccctgctac	Diese Arbeit
GDI 1	60	72	gagatagtgccggcatgaag accatgtagtcagtcttgtcaacc	Diese Arbeit
Cdc42	60	92	tggagtgttctgcacttacaca gctcttcttcgggttctggag	Diese Arbeit
IL-1 β	60	133	cagggacaggatatggagcaaca catctttcaacacgcaggacaggt	R. Geffers, HZI Braunschweig
<u>Referenzgene</u>				
GAPDH	60	66	gagtccactggcgtcttcac ttcacacccatgacgaacat	Diese Arbeit
GNB2LI	58	224	gagtgtggccttctcctctg gcttgcagtttagccagggttc	Zhang <i>et al.</i> , 2005
HRPT1	58	195	gaccagtcaacaggggacat aacactcgtgggtccttttc	Zhang <i>et al.</i> , 2005
RPL32	58	153	catctccttctcgcatca aaccctgtgtcaatgcctc	Zhang <i>et al.</i> , 2005
YWHAZ	60	94	acttttggtacattgtggctcaa ccgccaggacaaaccagtat	Vandesompele <i>et al.</i> , 2002

Um die Qualität der Primer zu überprüfen und gegebenenfalls die Annealing-Temperatur anzupassen, wurden „Kontroll-PCRs“ mit der synthetisierten cDNA durchgeführt. Für jedes Oligonukleotidpaar wurde ein 10 μ L Ansatz bestehend aus Primern (5 pmol), cDNA und Wasser hergestellt und dieser durch Zugabe von je 10 μ L Mastermix vervollständigt. Nach erfolgter PCR wurden 20 μ L der

DNA-Probe mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Diese Gele eignen sich besonders gut für die Trennung kleiner DNA-Fragmente (60-400 bp). Zur Größenabschätzung der Amplifikate wurde ein low range marker (#SM1193, Fermentas) als Größenstandard verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte in 0,5%igem TBE-Puffer für 70 min bei 75 mA. Anschließend wurde das Gel 10-15 min in einem Ethidiumbromidbad gefärbt. Ethidiumbromid gefärbte Banden konnten mittels UV-Licht detektiert werden.

Kontroll-PCR-Ansatz

cDNA	1	μL
Primermix for/rev (5 pmol)	1	μL
dH ₂ O	8	μL
Gesamt	10	μL

Mastermix

10 x PCR-Puffer	2	μL
dNTP-Mix (10 mM)	0,4	μL
LongAmp Taq-Polymerase (5 U/μL)	0,1	μL
dH ₂ O	7,5	μL
Gesamt	10	μL

Kontroll-PCR Programm

95° C	7	min	
94° C	10	s	} 35 Zyklen
60° C	20	s	
65° C	20	s	
65° C	5	min	
8° C		Pause	

6 % Acrylamidgel (2 kleine Gele)

10 x TBE	0,5	mL
40 % Acrylamid	1,5	mL
dH ₂ O	7,86	mL
Temed	16	μL
APS 10 % in dH ₂ O	66	μL

10 x TBE

Tris-Base	108	g
Borsäure	55	g
EDTA	9,3	g
Auf 1000 mL mit dH ₂ O auffüllen		

4.5.8 Quantitative Real Time-PCR

In dieser Arbeit wurden qRT-PCR-Analysen mit PMNs durchgeführt. Diese wurden mit *L. pneumophila* Corby infiziert und die Genexpression im Vergleich mit nicht infizierten Zellen untersucht.

Die Methode der qRT-PCR ermöglicht die gleichzeitige Analyse der Genexpression in verschiedenen Proben für ausgewählte Gene. Über die Fluoreszenzintensität eines in doppelsträngiger DNA interkalierenden Farbstoffes ermöglicht es kontinuierlich die Menge an Produkt während der PCR zu messen. Die Messung erfolgt am Ende jedes PCR-Zyklus. Je mehr Matrizen-DNA am Anfang der Reaktion vorhanden ist, desto weniger PCR-Zyklen sind notwendig, um den Punkt zu erreichen, an dem das Fluoreszenzsignal signifikant höher ist als der Fluoreszenzhintergrund. Dieser Punkt wird als C_t-Wert (threshold-cycle) definiert und befindet sich immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation. In der vorliegenden Arbeit wurde die qRT-PCR mit dem CFX96-System der Firma Bio-Rad und dem Fluoreszenzfarbstoff SsoFast EvaGreen (Bio-Rad) durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität des in doppelsträngige DNA interkalierenden EvaGreen ist wesentlich höher als die des freien EvaGreen. Zur Kontrolle der Amplifikate wurden die Proben nach dem letzten PCR-Zyklus in 0,5 °C-Schritten von 60 °C bis auf 95 °C erhitzt und dabei gleichzeitig die Fluoreszenzintensität gemessen. Die erste Ableitung der Fluoreszenzintensität ergibt die Schmelzkurve, in der das spezifische Produkt als einheitlicher Peak erscheinen sollte. Die Temperaturzunahme führt zur Trennung der doppelsträngigen DNA und die Fluoreszenzintensität ändert sich. Nach dem Schmelzpunkt trennt sich der DNA-Doppelstrang und es kommt zu einer schnellen Fluoreszenzabnahme. Ein Primer-Dimer-Artefakt würde einen Doppelpeak bei einer geringeren Schmelztemperatur ergeben. Es ist daher von großer Bedeutung für die spätere Auswertung, dass keine Doppelpeaks in den Schmelzkurven vorliegen.

Ermittlung von Referenzgenen

Bevor verschiedene Versuchszustände in der qRT-PCR miteinander verglichen werden, müssen sogenannte Referenzgene ermittelt werden. Diese Gene müssen unter allen Versuchsbedingungen gleich stark exprimiert vorliegen. Um

die relative cDNA eines Zielgens unter der gewählten Versuchsbedingung zu bestimmen, muss dessen Normalisierung über einen Abgleich mit den Expressionswerten der Referenzgene erfolgen. Für die Etablierung des qRT-PCR-Protokolls am CFX96-System der Firma Bio-Rad wurde der Fluoreszenzfarbstoff SsoFast EvaGreen (Bio-Rad) verwendet.

Hierfür wurden RT-PCR-Studien mit 100 ng cDNA der infizierten sowie nicht infizierten PMNs (5, 10, 20 min) und den in Tabelle 4.10 aufgelisteten potentiellen Kontrollprimern durchgeführt. Für jeden qRT-PCR-Ansatz wurde eine Wasserkontrollen sowie eine RNA-Kontrolle mitgeführt.

qRT-PCR-Ansatz

cDNA (100 ng/μL)	1	μL
Primermix for/rev (2,5 pmol)	1	μL
dH ₂ O	8	μL
SsoFast EvaGreen	10	μL
Gesamt	20	μL

qRT-PCR Programm

95 °C	30	s	
95 °C	2	s	} 40 Zyklen
60 °C	3	s	
95 °C	10	s	
65-95 °C (in 0,5 °C inc.)	5	s/Schritt	
8 °C		Pause	

Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe von GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) und lieferte eine Rangfolge der Referenzgene gemäß ihrer Expressionsstabilität (Wiedemann *et al.*, 2004). RPL32 sowie GNB2LI wurden in den PMNs am stabilsten exprimiert und für alle weiteren Studien als Referenzgen verwendet. Die Expressionslevel der zu untersuchenden Gene konnte nun in Relation zu den gewählten Referenzgenen gesetzt werden.

Die Auswertung der in der qRT-PCR erhaltenen Rohdaten erfolgte über ein modifiziertes R-Packet (Ritz und Spiess, 2008) nach dem sigmoidalen Modell (R. Münch, TU Braunschweig). Ab einem Faktor ≥ 2 zwischen zwei Proben wurde ein Gen als unterschiedlich reguliert betrachtet.

4.6 Zellkultur

4.6.1 Kultivierung und Konservierung von NCI-H292 Lungenepithelzellen

Die Lungenepithel Zell-Linie NCI-H292 wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm²-Zellkulturflaschen (TPP) kultiviert. Als Medium wurde RPMI 1640 mit Phenolrot verwendet, dem zusätzlich 2 mM L-Glutamin sowie 10 % FCS hinzugefügt wurden. Zum Ansetzen einer frischen Kultur wurden die im Stickstoff eingefrorenen Zellen zügig bei 37 °C aufgetaut und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche mit 15 mL vorgewärmtem Medium überführt. Um die toxische Wirkung von DMSO auf die Zellen zu verringern, erfolgte ein Medienwechsel sobald die Zellen adhärent waren (nach ca. 6 h). Das Medium wurde alle zwei Tage, spätestens wenn es gelb war, erneuert. Die Zellen wurden gesplittet, wenn sie 80-90 % des Flaschenbodens bedeckten. Hierfür wurde das Medium abgekippt und die Zellen einmal mit warmen PBS pH 7,5 gewaschen. Durch Zugabe von 5 mL warmem Trypsin-EDTA und Inkubation bei 37 °C für 15 min lösten sich die Zellen vom Flaschenboden. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von 5 mL RPMI-Medium gestoppt, die Zellen in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (100 x g, 5 min, RT) und in 10 mL frischem Medium aufgenommen. Sollten die Zellen weiter kultiviert werden, wurden 1-3 mL der Zellsuspension in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche mit 15 mL Medium überführt und bei 5 % CO₂ kultiviert. Hatten die Zellen Passage x+15 erreicht wurde eine neue Kultur aufgetaut.

Für die Stammhaltung wurden trypsinisierte Zellen auf 1x10⁸ Zellen/mL in Kryomedium eingestellt und auf Kryoröhrchen verteilt. Das Kryomedium enthielt Kulturmedium mit zusätzlichen 10 % FCS und 10 % DMSO. Anschließend wurden die Zellen in einem Nalgene Cryo 1C Freezing Container, der mit Isopropanol gefüllt war, bei -80 °C gelagert. Isopropanol kühlt um 1 °C pro Minute ab und sorgt für einen schonenden Einfrierprozess der Zellen. Am nächsten Tag konnten die Stablate aus dem Container entnommen und in flüssigen Stickstoff überführt werden.

4.6.2 Kultivierung und Differenzierung von U937-Makrophagen

Die Kultivierung der humanen Makrophagen Zell-Linie U937 erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm²-Zellkulturflaschen (TPP). Als Medium wurde RPMI 1640 mit Phenolrot verwendet, dem zusätzlich 2 mM L-Glutamin sowie 10 % FCS hinzugefügt wurden. Zum Ansetzen einer frischen Kultur wurden die im Stickstoff eingefrorenen Zellen zügig bei 37 °C aufgetaut, in 10 mL vorgewärmtes Kulturmedium überführt und zentrifugiert (200 x g, 10 min, RT). Der Überstand wurde bis auf 1 mL über dem Zellsediment abgenommen und die Zellen in 15 mL frischem Kulturmedium resuspendiert. Die weitere Kultur erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm²-Zellkulturflaschen (TPP). Die Generationszeit von U937 betrug ungefähr 2 Tage. Zum Splitten der Zellen wurden 1-2 mL (1-2x10⁵ Zellen/mL) einer Kultur in eine neue Flasche mit 18 mL vorgewärmtem Medium überführt. Es ist wichtig, die Zellen nicht zu dünn auszusäen, da sie sich bei geringer Zellzahl nicht gut vermehren. Weiterhin wurden nur Zellen bis Passage x+14 verwendet, da sich dann ihre Eigenschaften änderten und sie nicht mehr für Infektionsstudien brauchbar waren.

Die Zugabe von Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) stimuliert die Differenzierung von U937 Suspensionszellen zu Makrophagen (u. a. Adhärenz, phagozytische Aktivität). Hierzu wurden U937 Zellen in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (400 x g, 10 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in frischem Medium aufgenommen. Mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt und für Infektionsstudien in 24-Wellplatten auf 1x10⁶ /mL bzw. 3x10⁵ Zellen/mL für Zytotoxizitäts-Assays (s. Abschnitt 4.4.3) in 96-Wellplatten eingestellt. Pro Milliliter Zellsuspension wurde 10 nmol PMA hinzugefügt. Nach 48-stündiger Inkubation mit PMA bei 37 °C und 5 % CO₂ konnten die Zellen für die jeweiligen Versuche genutzt werden.

4.6.3 Isolation und Differenzierung von mononuklearen Zellen

Die Isolation von mononuklearen Zellen (MNCs) aus humanem Blut fand unter Verwendung einer Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll PaqueTM Plus (17-1-440-02, GE Healthcare) statt. Hierbei werden die Blutbestandteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte in einem Gradienten aufgetrennt. Zellen mit hoher Dichte wandern schneller als Zellen mit geringerer Dichte. Für die Versuche wurde ausschließlich peripher venöses Blut von allergiefreien, gesunden Personen verwendet. Die Blutentnahme erfolgte in S-Monovetten mit Lithium-Heparin-beschichteten Kügelchen. In 50 mL Reaktionsgefäße wurden 9 mL Ficoll (Raumtemperatur) vorgelegt, mit 40 mL verdünntem Blut (1:2 in 1 x PBS pH 7,5) vorsichtig überschichtet und zentrifugiert (400 x g, 30 min, deceleration: 0, RT). Dies führte zur dichteabhängigen Bildung von Schichten aus Erythrozyten, Ficoll, MNCs und Plasma (Abbildung 4.1). Zunächst wurde die obere Plasmaschicht mittels einer Vakuumpumpe und Pasteurpipetten bis ca. 0,5 – 1 cm über der milchig-weißen MNC-Schicht abgesaugt. Danach wurde die MNC-Schicht vorsichtig in ein eiskaltes 50 mL-Reaktionsgefäß überführt, mit eiskaltem RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin aufgefüllt und zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4 °C). Der Zellüberstand konnte abgegossen und die verbleibenden Erythrozyten durch Waschen mit eiskaltem MilliQ lysiert werden. Hierzu wurden 9 mL eiskaltes MilliQ für genau 30 s zu den Zellen gegeben und vorsichtig resuspendiert. Die Lyse der Erythrozyten wurde durch Zugabe von 1 mL 10 x PBS gestoppt und das Volumen mit eiskaltem Medium auf 50 mL aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4 °C). Der Waschschrift wurde wiederholt, bis alle Erythrozyten lysiert waren. Pro Milliliter Vollblut können ca. $1\text{--}1,5 \times 10^6$ Zellen/mL gewonnen werden (d. h. 28 mL Vollblut entsprechen 28 mL mit $2,8 \times 10^6$ MNC/mL).

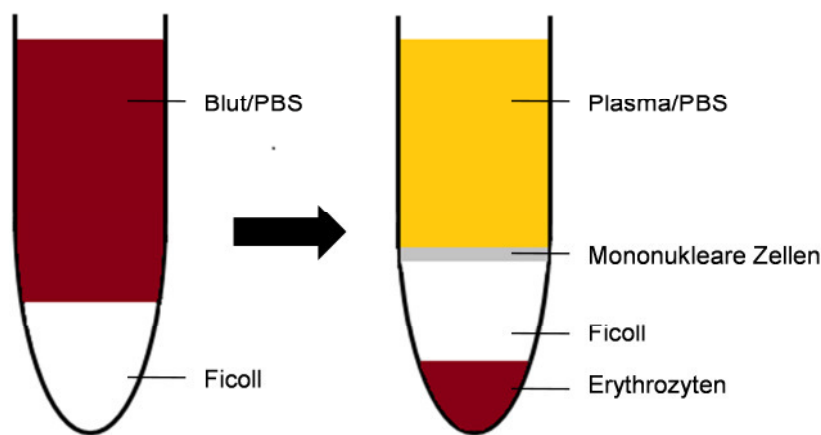


Abbildung 4.1: Isolation von mononuklearen Zellen über einen Ficoll-Gradienten.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in Medium mit 4 % (v/v) hitzeinaktiviertem humanem Serum (huS) aufgenommen. Für die Gewinnung des Serums wurde humanes Vollblut in ein steriles Glasröhrchen überführt und 4–6 h stehen gelassen. Das Blut wurde in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (900 x g, 45 min). Die oberste Serumschicht wurde abgenommen und durch Erwärmen für 30 min bei 56 °C inaktiviert. Die Lagerung des abgekühlten Serums erfolgte bei -20 °C.

Mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt und auf 1×10^6 Zellen/mL eingestellt. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen 1:1 mit Trypan blau gemischt und im Mikroskop betrachtet. Der Anteil lebender Zellen (nicht blau) betrug immer über 98 %.

Die isolierten MNC konnten nun für die Differenzierung zu Makrophagen verwendet werden. Hierfür wurde je 1 mL mit 1×10^6 Zellen/mL pro Well einer 24-Wellplatte (662160, Greiner Bio-one) ausgesät und 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nicht adhärenzte Zellen wurden beim folgenden Medienwechsel entfernt. Das neue Medium enthielt RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin, 4 % hitzeinaktiviertes huS sowie 2 ng/mL rekombinanten, human macrophage stimulating factor (M-CSF). Nach 6-7 Tagen Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ konnten die zu Makrophagen differenzierten Zellen für Infektionsstudien eingesetzt werden.

4.6.4 Isolation von polymorphkernigen Leukozyten

Die Isolation von PMNs aus humanem Blut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Für die Blutentnahme wurde ausschließlich peripher venöses Blut von allergiefreien, gesunden Personen verwendet. Blut wurde in S-Monovetten mit Lithium-Heparin-beschichteten Kügelchen entnommen und 1:1 mit 1 x PBS pH 7,5 verdünnt. Für den Gradienten wurden 8 mL Ficoll PaqueTM Plus (RT) (GE Healthcare) vorsichtig über 10 mL raumtemperiertes Histopaque 1119 (Sigma) in 50 mL Reaktionsgefäße geschichtet. Je 20 mL verdünntes Vollblut wurde vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen und zentrifugiert (800 x g, 20 min, acceleration: 1, deceleration: 0, RT). Durch ihre unterschiedliche Dichte bildeten die Blutbestandteile nach der Zentrifugation folgende Schichten aus: Erythrozyten (A), eine rosa Schicht aus PMNs und Histopaque (B), eine farblose Ficoll-Schicht (C), ein weißer Monozytenring (D), und eine gelbliche Plasmaschicht (Abbildung 4.2).

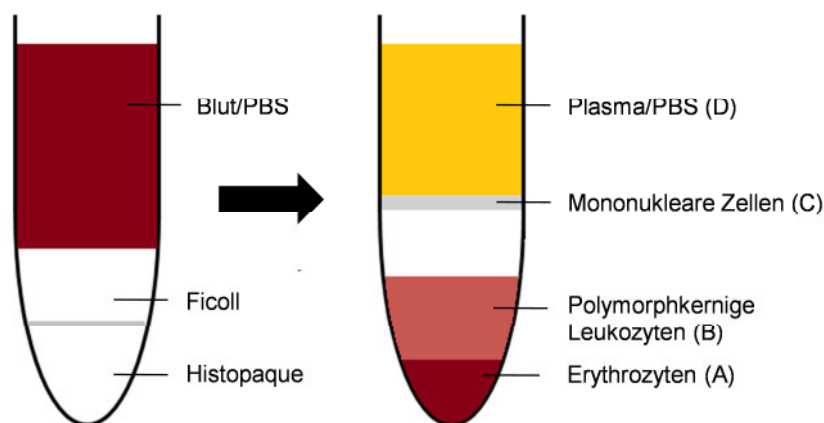


Abbildung 4.2: Histopaque / Ficoll-Gradient zur Isolation polymorphkerniger Leukozyten.

Die oberen Schichten wurden mittels Vakuumpumpe und einer Pasteurpipette bis ca. 1 cm über der rosafarbenen PMN-Schicht abgesaugt. Diese wurde anschließend in ein frisches Röhrchen überführt, mit RPMI 1640 und 2 mM L-Glutamin auf 50 mL aufgefüllt und zentrifugiert (800 x g, 10 min, acceleration: 1, deceleration: 0, RT). Der Überstand wurde dekantiert und die vorhandenen Erythrozyten mit 9 mL eiskaltem MilliQ für genau 30 S lysiert. Danach folgte die sofortige Zugabe von 1 mL 10 x PBS. Das Röhrchen wurde mit 1 x PBS pH 7,5 auf 50 mL aufgefüllt und erneut zentrifugiert (800 x g, 10 min, acceleration: 1, deceleration: 0, RT). Dieser Waschschrift wurde wiederholt, bis keine

Erythrozyten mehr vorhanden waren. Die Zellen konnten nun für Infektionsstudien (s. Kapitel 4.7.1) oder zur Analyse von neutrophil extracellular traps (NETs) (s. Kapitel 4.7.3) verwendet werden. Hierzu wurden sie in entsprechenden Medien resuspendiert und die gewünschte Zellzahl mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt und eingestellt. Mittels FACS (FACScalibur, BD Biosciences) wurde die Reinheit der PMN-Fraktion durch Oliver Goldmann (HZI, Braunschweig) bestimmt. Diese lag bei 91,2 % (s. Abbildung 8.1).

4.6.5 Kultivierung und Konservierung von *Dictyostelium discoideum*

Die Kultivierung von *D. discoideum* erfolgte in HL5-Medium bei 21 °C in 75 cm² Zellkulturflaschen (90076, TPP) oder in 25 mL Kolben bei 130 rpm und 25 °C. Da *D. discoideum* ein haploider Organismus ist und häufig Spontanmutationen auftreten, wurden die Amöben nicht kontinuierlich weiterkultiviert. Stattdessen wurden alle zwei Wochen frische Kulturen aus eingefrorenen Sporen bzw. Zellen angelegt. Die Kulturen konnten anschließend für 2 Wochen bei 4 °C gelagert werden und zum Beimpfen neuer Hauptkulturen verwendet werden. Zum Anlegen einer Hauptkultur wurden eingefrorene Zellen zügig in der Hand aufgetaut, in ein Röhrchen mit 10 mL HL5 überführt und zentrifugiert (230 x g, 7 min, 21 °C) um das DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit 15 mL HL5 in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt (Standkultur). Sporen mussten nicht zentrifugiert werden. Nach ca. 2-4 Tagen konnte die Amöbenkultur zum Beimpfen einer Hauptkultur verwendet werden. Hierfür wurden die Zellen durch starkes Klopfen vom Flaschenboden gelöst und 1,5 mL der Zellkultur in einen 100 mL-Kolben mit 25 mL HL5 überführt. Die Vermehrung erfolgte über 3 Tage bei 25 °C und 130-140 rpm (Schüttelkultur). Neben dem Wildtyp wurden auch *D. discoideum*-Mutanten untersucht. Diese wurden durch homologe Rekombination hergestellt und besaßen Antibiotikaresistenzen. Zur Kultur von Mutanten wurden dem Medium falls nötig die entsprechenden Antibiotika zugefügt.

Sollten die Amöben für Infektionsstudien verwendet werden, wurde darauf geachtet, dass sich die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase befand

($3\text{-}4 \times 10^6$ Zellen/mL). Eine Besonderheit ergab sich für die Kultivierung von *D. discoideum* AX2 *rpkA*⁻. Dieser Stamm wächst nicht in Schüttelkultur und wurde daher nur in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden nie länger als eine Woche verwendet und konnten nicht bei 4 °C aufbewahrt werden.

Für die Konservierung von *D. discoideum* wurden Sporen in flüssigem Stickstoff (N_{2(l)}) eingefroren. Dafür wurden 300-400 mL Schüttelkulturen durch Beimpfen mit 10 mL Vorkultur angesetzt. Nach 3-4 Tagen wurden die Zellen geerntet (230 x g, 7 min, 21 °C) und in 1 x Soerensenpuffer (SP) aufgenommen. Die Zelldichte wurde auf mindestens 1×10^7 /mL eingestellt und 400 µL dieser Suspension wurde durch Schwenken auf einer Soerensenagarplatte verteilt. Nach kurzem Antrocknen der Platten wurden diese für 3-4 Tage in einer feuchten Kammer bei 21 °C im Dunkeln inkubiert. Dabei zeigte der Plattendeckel nach oben. Die gebildeten Sporenköpfe (gelb) wurden schließlich mit 2 mL SP pro Platte abgespült, auf Kryoröhrchen verteilt und direkt in N_{2(l)} eingefroren.

Bei den Mutanten *D. discoideum* AX2 ($\Delta rpkA$), *D. discoideum* AX2 ($\Delta atg9$) sowie der Doppelmutante *D. discoideum* AX2 (*atg9/cdcD_R155C-RFP*) liegt eine Störung im Sporulationsprozess vor. Es werden entweder keine oder nur stark verkümmerte Sporen gebildet. Deshalb mussten für eine dauerhafte Konservierung Zellstabilate hergestellt werden. Zellen einer frischen Kultur wurden geerntet (230 x g, 7 min, 21 °C) und in HL5 auf 8×10^6 Zellen/mL eingestellt. Zu 400 µL dieser Suspension wurden 100 µL Pferdeserum zugefügt. Anschließend wurden je 100 µL DMSO mit 400 µL HL5 sterilfiltriert (0,22 µm) zu den Zellen gegeben. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen überführt und in einem mit Isopropanol gefüllten Nalgene Cryo 1C Freezing Container bei -80 °C gelagert. Nach 24 h konnten die Zellen in N_{2(l)} überführt werden.

HL5-Medium

Pepton (Neutralized Bacteriological Peptone, Oxoid)	14,3 g
Hefeextrakt (Bacto™, Difco)	7,15 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,64 g
KH ₂ PO ₄	0,49 g
Maltose	18 g
Mit 10 N KOH auf pH 6,9–7,1 einstellen, mit dH ₂ O auf 1000 mL auffüllen und steril filtrieren (0,22 µm).	

50 x Soerensenpuffer

KH ₂ PO ₄ (734 mM)	99,86 g
Na ₂ HPO ₄ (125 mM)	17,8 g

Mit 1000 mL dH₂O auffüllen und autoklavieren. 1 x Soerensenpuffer wird durch eine 1:50 Verdünnung in dH₂O gewonnen und entspricht einem 17 mM PO₄³⁻-Puffer mit einem pH-Wert von 6. Zur Herstellung von Soerensenagar wurden 15 g Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

4.6.6 Zytotoxizitäts-Assay (Alamar blue)

In dieser Arbeit wurde Alamar blue (Biozol) zur Bestimmung der Zytotoxizität von *B. pumilus*-Extrakt auf U937 Makrophagen eingesetzt. Außerdem wurde die zytotoxische Wirkung von Liposomen sowie extrazellulärem Gentamicin auf die humane Lungenepithel Zell-Linie NCI-H292 sowie U937 Makrophagen untersucht. Das Reagenz enthält Resazurin (blau), einen Redoxfarbstoff, welcher durch metabolisch aktive Zellen zu Resorufin (pink, fluoreszierend) reduziert wird. Die Kultivierung und Differenzierung der jeweiligen Zellen erfolgte wie in den Kapiteln 4.6.1 und 4.6.2 beschrieben. Die Zellen wurden auf 3×10^5 /mL in RPMI 1640 mit 10 % FCS und 2 mM L-Gln eingestellt und je 200 µL pro Well einer 96-Wellplatte (92696, TPP) ausgesät. Die Differenzierung von Makrophagen erfolgte durch die Zugabe von 10 nmol PMA für 24 h zu den Zellen. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das alte Medium durch frisches Medium mit PMA ersetzt und die Makrophagen für weitere 24 h inkubiert. NCI-H292 Zellen konnten bereits nach 18 h für Zytotoxizitätstests verwendet werden. Hierfür wurden zunächst Vorverdünnungen der Testsubstanzen (*B. pumilus* Rohextrakt bzw. Liposomen oder freies Gentamicin) in einer 96-Wellplatte erstellt. Im ersten Well wurde das Doppelte der gewünschten Konzentration in 300 µL vorgewärmtem Medium eingestellt und in alle übrigen Wells wurden 150 µL Medium vorgelegt. Ausgehend vom ersten Well wurden Verdünnungsreihen (1:1) erstellt und die letzten 150 µL verworfen. Nun wurde der Kulturüberstand der U937 bzw.

NCI-H292 Zellen entfernt und durch je 100 μL der Verdünnungen ersetzt. Die Inkubation mit *B. pumilus* Extrakt (maximal 400 $\mu\text{g/mL}$) erfolgte über 24 h und 48 h. Liposomen sowie Gentamicin bis zu einer Konzentration von 1 mg/mL wurden für 1 h und 2 h zu den Zellen gegeben. Nach erfolgter Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 wurde Alamar blue 1:1 mit Medium verdünnt und je 50 μL zu den Zellen gegeben (10 % Endkonzentration). Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 5 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Auswertung erfolgte über die photometrische Bestimmung der OD bei 595 nm. Die Viabilität entsprach der Fluoreszenzintensität bei Zugabe der Testsubstanz, prozentual bezogen auf die Kontrolle. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die 100 % Viabilität entsprachen. Bei Zytotoxizitätsbestimmungen mit *B. pumilus* Extrakt wurden zusätzlich entsprechende Lösungsmittelkontrollen mit MeOH mitgeführt. Als Negativkontrolle diente 25 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Dieses ist toxisch für Zellen und reduziert deren Viabilität.

4.7 Infektionsstudien

4.7.1 Infektion von Lungenepithelzellen und Makrophagen

Die Kultivierung und Differenzierung von U937 Makrophagen erfolgte wie in Abschnitt 4.6.2 beschrieben. Für Infektionsstudien wurden die Zellen auf 1×10^6 /mL in Infektionsmedium (RPMI 1640 mit 10 % FCS und 2 mM L-Gln) eingestellt und je 500 μL pro Well einer 24-Wellplatte ausgesät. Ausdifferenzierte Makrophagen wurden mit *L. pneumophila* Corby (MOI 5) infiziert. Hierfür wurden stationäre Legionellen auf 5×10^6 /mL in vorgewärmtem Infektionsmedium eingestellt. Das alte Medium der Zellen wurde entfernt und durch 500 μL der *Legionella*-Suspension ersetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 wurden extrazelluläre Bakterien durch dreimaliges Waschen mit 1 mL vorgewärmten 1 x PBS entfernt.

Behandlung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen mit Liposomen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Gentamicin-beladenen Liposomen auf den Infektionsverlauf von *L. pneumophila* Corby in NCI-H292 Lungenepithelzellen sowie U937 Makrophagen untersucht. Das Projekt wurde in Kooperation mit der Firma Rodos Biotarget durchgeführt, welche die Liposomenchargen zur Verfügung stellte. Die Herstellung der Liposomen erfolgte über das Verfahren der reverse phase evaporation (REV) oder mittels dual asymmetric centrifugation (DAC) von M. Holzer (Pharmazeutische Technologie, Universität Freiburg). Um eine gleichbleibende Qualität der Chargen zu gewährleisten wurde jede Charge hinsichtlich folgender Qualitätsmerkmale untersucht: Bestimmung des Gesamtlipidgehalts, des hydrodynamischen Durchmessers (M. Holzer, Pharmazeutische Technologie, Universität Freiburg) sowie die Beladungseffizienz mittels ELISA (Rodos BioTarget). Die Beladungseffizienz mit Gentamicin (Gm) für REV-Liposomen betrug 10 % und 40 % für DAC-Liposomen. Extrazelluläres Gm wurde nicht entfernt. Zusätzlich wurde die Intaktheit, Größe und Form der Liposomen (s. Abschnitt 4.8.2) im Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

Um festzustellen, welche Wirkung extrazelluläres Gm, Gm-beladene REV- oder DAC-Liposomen auf die Vermehrung der Legionellen haben, wurden infizierte U937 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Gm (250 µg/mL-4 mg/mL) sowie Liposomen (Gm-Gesamtkonzentration 250 mg/mL-400 µg/mL) für weitere 1-2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurde das extrazelluläre Gm durch dreimaliges Waschen mit 1 mL vorgewärmtem 1 x PBS entfernt und durch 1 mL Infektionsmedium ersetzt. Direkt nach erfolgter Inkubation mit Gm bzw. Liposomen, sowie nach weiteren 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Bakterienzahl pro Milliliter bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe einer umgeknickten, blauen Spitze aus dem Well gelöst, in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (20.000 x g, 7 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment in exakt 1 mL MilliQ resuspendiert. Der weitere Zellaufschluss erfolgte durch starkes Vortexen für mindestens 1 min. Es wurden Verdünnungsreihen in 1 x PBS erstellt und je 20 µL zur Bestimmung der cfu/mL auf viereckige BCYE-Agarplatten ausplattiert. Nach drei- bis viertägiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ konnten die Platten

ausgewertet werden. Als Referenz dienten Infektionen, bei denen keine Gm- oder Liposomenbehandlung stattfand, jedoch alle durchgeführten Waschschr tte synchron durchgeführt wurden.

4.7.2 Infektion von polymorphkernigen Leukozyten

PMNs wurden wie in Abschnitt 4.6.4 beschrieben aus humanem Blut isoliert und mit *L. pneumophila* Corby infiziert. Es ist bekannt, dass Legionellen nur unter Vorhandensein von humanem Serum bzw. Immuns serum von PMNs phagozytiert werden (Horwitz & Silverstein 1981). Für spätere qRT-PCR-Studien wurde zunächst ein Protokoll mit optimalen Infektionsbedingungen etabliert. Hierbei wurden die Zusammensetzung des Infektionsmediums, die verwendete MOI sowie die Infektionsdauer variiert.

Fluoreszenzmikroskopie-gestützte Optimierung der Infektionsbedingungen

Die Optimierung des Infektionsmediums erfolgte Fluoreszenzmikroskopie-gestützt unter Verwendung von GFP-exprimierenden *L. pneumophila* Corby. Somit konnte relativ einfach die Phagozytoserate der Infektion ermittelt werden. Für die Infektion wurden Deckgläschen in 24-Wellplatten zuvor mit 0,01 % Poly-L-Lysin beschichtet um eine bessere Adhärenz der PMNs zu erreichen. Je 60 μ L Poly-L-Lysin wurde für 15 min bei RT auf die Deckgläschen gegeben und anschließend durch dreimaliges Waschen mit 1 mL 1 x PBS entfernt. Eine halbe Stunde vor Infektion wurden je 5×10^5 PMNs in RPMI 1640 mit 2 mM L-Gln und 10 % FCS bzw. 25 % huS pro Well ausgesät und bei 37 $^{\circ}$ C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Infektion wurden ausschließlich stationäre *L. pneumophila* Corby-GFP mit einer MOI von 10 verwendet. Im Vorfeld erfolgte die Opsonisierung der Legionellen in 2 mL Reaktionsgefäßen mit den in Tabelle 4.11 aufgeführten Varianten a-f für 1 h bei 300 rpm und 37 $^{\circ}$ C.

Tabelle 4.11: Opsonisierung von *L. pneumophila* Corby.

a)	25 % huS
b)	10 % FCS
c)	25 % huS + 1 % Lp-AK (rabbit-anti- <i>L. pneumophila</i> Sg 1-12, polyklonal)
d)	25 % huS + 0,5 % Lp-AK (rabbit-anti- <i>L. pneumophila</i> Sg 1-12, polyklonal)
e)	10 % FCS + 1 % Lp-AK (rabbit-anti- <i>L. pneumophila</i> Sg 1-12, polyklonal)
f)	5 % Immunserum (Lp1 MAbtyp Allentown France, Mab3-1 positiv)

Pro 1×10^7 Legionellen wurde ein Opsonisierungsvolumen von 100 μL gewählt, das danach auf $1 \times 10^7/\text{mL}$ eingestellt wurde. Wenn beispielsweise 7×10^7 Legionellen benötigt wurden, wurde ein Opsonisierungsansatz von 700 μL gewählt. Pro 100 μL Volumen wurde 1 μL des jeweiligen Antikörpers (AK) hinzugefügt und der Reaktionsansatz für 1 h bei 300 rpm und 37 °C inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Bakterien in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt, mit Infektionsmedium (RPMI mit 25 % huS bzw. 10 % FCS) auf 1×10^7 Bakterien/mL eingestellt. Nachdem die PMNs an die Deckgläschen adhärirt waren, wurde der Kulturüberstand entfernt und durch 500 μL der jeweiligen *Legionella*-Suspension ersetzt. Die Infektion wurde durch Zentrifugation (300 x g, 5 min) synchronisiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 wurden die Deckgläschen aus den Wells entnommen und extrazelluläre Bakterien durch vorsichtiges Schwenken in 1 x PBS entfernt. Die Zellen wurden anschließend für 30 min bei RT oder ü.N. bei 4 °C in 2%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Präparate wurden dreimal in PBS gewaschen, in einem Tropfen mounting medium (Dako) auf einem Objektträger eingebettet. Und bei 4 °C aufbewahrt. Die Auswertung der Infektion erfolgte am Fluoreszenzmikroskop indem die Anzahl infizierter PMNs bestimmt wurde. Durch die Opsonisierung von Legionellen mit 1 % Lp-AK in 10 % FCS konnte eine 100%ige Aufnahme aller Bakterien erreicht werden. Da es keine Unterschiede in Bezug auf die verwendeten AK (Immunserum bzw. Lp-AK) gab, wurde für die weiteren Versuche der polyklonale Lp-AK verwendet.

Optimierung der MOI und Analyse des Infektionsverlaufs

Für qRT-PCR-Studien war es von Bedeutung möglichst viele Zellen gleichzeitig zu infizieren, den Infektionsverlauf zu analysieren und eine frühzeitige Apoptose der PMNs zu verhindern. Je 5 mL PMNs ($1 \times 10^6/\text{mL}$) wurden in 50 mL-Reaktionsgefäßen mit opsonierten (1 % Lp-AK, 10 % FCS) *L. pneumophila*

Corby einer MOI 2, 5 bzw. 10 infiziert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C unter Rotation (Stufe 4-5) im Hybridisierungssofen. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden 100 µL-Proben entnommen, Verdünnungsreihen in PBS erstellt, auf BCYE-Agar ausplattiert und für 3-4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen mikroskopisch auf Aufnahme sowie Apoptose (Bläschenbildung) untersucht. Um die Aktivität der isolierten PMNs zu überprüfen, wurden die Infektionen parallel mit avirulenten *E. coli* HB101 (MOI 5) durchgeführt.

Infektionsansatz für qRT-PCR-Studien

In qRT-PCR-Studien sollte die Genexpression ausgewählter Zielgene (s. Tabelle 4.10) von nicht infizierten zu infizierten PMNs analysiert werden. Hierfür PMNs in RPMI 1640 mit 10 % FCS und 5 mM L-Gln (ohne Phenolrot) auf 5×10^6 /mL eingestellt. Je nach Ausbeute wurden zwischen 5-8 mL der PMNs in 50 mL-Reaktionsgefäßen mit zuvor opsonisierten *L. pneumophila* Corby (MOI 5) langsam rotierend bei 37 °C im Hybridisierungssofen (Stufe 4-5) infiziert. Hierbei wurde immer 1 Volumen PMN-Suspension mit $\frac{1}{4}$ Volumen der opsonisierten Bakterien für die Infektion verwendet (z.B. 5 mL PMNs (5×10^6 /mL) und 1,25 mL *L. pneumophila* Corby (1×10^8 /mL)). Nach 5, 10 und 20 min wurden die Reaktionen auf Eis gestoppt und für die Isolation von RNA verwendet (Abschnitt 4.5.4). Für jeden Zeitpunkt wurden ebenfalls nicht infizierte Zellen mitgeführt und entsprechend behandelt. Die Infektionsrate wurde zusätzlich mikroskopisch überprüft. Hierfür wurden 200 µL der PMN-Suspension in ein 8-Well-Objektträger (Ibidi) überführt und mit opsonisierten *L. pneumophila* Corby mcherry infiziert. Zu dem gewünschten Zeitpunkt wurde die Anzahl infizierter PMNs mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Infektionsrate lag immer zwischen 20-30 % mit 10-12 Legionellen pro PMN.

4.7.3 Induktion von neutrophil extracellular traps bei polymorphkernigen Leukozyten

Die Induktion von NETs in humanen PMNs wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. PMNs wurden zunächst wie in Kapitel 4.6.4 beschrieben aus humanem Blut isoliert. Allerdings wurden die PMNs im letzten Schritt in RPMI 1640 ohne Phenolrot mit 2 mM L-Glutamin und 2 % hitzeinaktiviertem humanem Serum (PAA) aufgenommen. Eine Hitzeinaktivierung des Serums für 30 min bei 70 °C war nötig, um Nukleasen zu inhibieren. Die PMNs wurden auf 1×10^6 Zellen/mL eingestellt und je 500 µL auf sterile Deckgläschen in 24-Wellplatten ausgesät.

Um die Induktion von NETs durch *L. pneumophila* Corby mcherry und *E. coli*-GFP zu untersuchen, wurden PMNs in 24-Wellplatten ausgesät und 30 min vor Zugabe der Bakterien (MOI 10 oder 20) mit 10 µg/mL Cytochalasin D (cytD) bei 37 °C inkubiert. CytD bewirkt eine Hemmung der Aktin-Polymerisation und verhindert eine Aufnahme der Bakterien. Die Ausbildung von NETs wird dadurch nicht beeinflusst. *E. coli*, *L. pneumophila* Corby bzw. opsonisierte *L. pneumophila* Corby (s. Abschnitt 4.7.2) wurden anschließend für 2-3 h direkt zu den Zellen gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde 16%igem PFA in einer Endkonzentration von 4 % zu den Zellen pipettiert und diese für 30 min bei RT fixiert. Die Präparate wurden mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit einem Tropfen DAPI (1 µg/mL) auf Parafilm für 10 min im Dunkeln inkubiert. Bei DAPI handelt es sich um einen Farbstoff, der DNA und damit auch NET-Strukturen anfärbt. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut gewaschen um das PFA zu entfernen, ein Tropfen mounting medium (Darko) auf einen Objektträger gegeben und die Präparate darin eingebettet. Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden die Präparate bei -20 °C eingefroren. Zu jeden Versuchsansatz und Zeitpunkt wurden Negativ- sowie Positivkontrollen mitgeführt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Hier erfolgte keine Ausbildung von NETs. Die Induktion von NETs erfolgte durch Zugabe von 25-50 nM PMA für 2 h und diente als Positivkontrolle. NETs wurden außerdem für 2 h mit 25 nM PMA induziert um auszuschließen, dass DNasen von Bakterien produziert werden und zu einer ungewünschten NET-Degradation führen. Anschließend wurden *Legionella* bzw. *E. coli* (MOI 20) für 1-2 h zu den Zellen gegeben und diese nach erfolgter

Inkubation fixiert. Bei Abwesenheit von Nukleasen sollte kein Abbau von NET-Strukturen erfolgen. Die Versuche wurden dreimal mit Blut verschiedener Spender durchgeführt.

DNase-Aktivität von *L. pneumophila* Corby

L. pneumophila besitzt mit *tatD* und *lidH* zwei Gene, die für DNasen kodieren. Aus diesem Grund wurden Kulturüberstände stationärer *L. pneumophila* Corby mit Hilfe von DNase Test-Agar (Difco) auf das Vorhandensein von DNase überprüft. Testplättchen (Macherey & Nagel, Durchmesser = 9 mm) wurden auf den Agar gelegt und je 100 µL Kulturüberstand aufgetropft. Die Platten wurden 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Positivkontrolle wurde DNase I verwendet, die den türkisen Farbstoff der Nuklease-Platten abbaute.

4.7.4 Infektion von *Dictyostelium discoideum* mit *Legionella*

In dieser Arbeit wurden sowohl Invasionsstudien mit *D. discoideum* und *Legionella* in 24-Wellplatten und als auch Infektionsstudien über 72 h in 25 cm²-Zellkulturflaschen durchgeführt. Infektionsstudien über einen Zeitraum von 48 h waren in 24-wellplatten nicht möglich, da die Platten austrockneten und die Standardabweichungen zu späten Infektionszeitpunkten stark anstiegen. Zur Bestimmung der Aufnahmerate waren Infektionen in kleinen Volumina zu 300 µL gut geeignet, da hierdurch eine räumliche Nähe der Legionellen zu den Zellen gegeben war – und damit eine zeitgleiche Aufnahme der Bakterien ermöglicht wurde.

Die Anzucht von *D. discoideum* erfolgte durch Beimpfen von 30 mL HL5 mit 2-3 mL Vorkultur des jeweiligen Stammes und anschließender Kultivierung auf eine Zellzahl von ca. 3x10⁶/mL bei 160 rpm und 25 °C im Dunkeln. Eine Ausnahme stellten *rpkA*⁻-Zellen dar, die sich nicht in Schüttelkultur vermehrten. Hier wurden die Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 21 °C im Dunkeln kultiviert (AX2 wurde entsprechend kultiviert). Eine Kultivierung von *rpkA*⁻ aus Kulturen, die bei 4 °C aufbewahrt wurden, war schwierig. Da häufige Subkultivierung die Mutationsbildung fördert, wurden die Zellen nie länger als eine Woche für Infektionsstudien verwendet.

Für Infektionen wurden *D. discoideum*-Kulturen zentrifugiert (320 x g, 5 min, RT) und zweimal mit 20 mL Soerensenpuffer (SP) gewaschen um altes Medium sowie Antibiotikarückstände zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in Infektionsmedium (1:2 Gemisch aus HL5 und SP) aufgenommen. Für die Versuche wurden ausschließlich drei Tage alte *Legionella*-Plattenkulturen bzw. ü.N.-Kulturen in YEB (stationäre Wachstumsphase, $OD_{600} \geq 3$) verwendet. Legionellen wurden mit 1 mL SP von der Platte geschwemmt, zentrifugiert (5000 x g, 3 min) und in SP resuspendiert. Anschließend wurde die optische Dichte bei 600 nm bestimmt und anhand dieser die gewünschte Zellzahl im Infektionsmedium eingestellt.

Invasionsassay

Um die Aufnahmerate von *Legionella* durch verschiedene *D. discoideum*-Stämme im Vergleich zum Wildtyp AX2 zu bestimmen, wurde zunächst eine Zellzahl von 1×10^6 /mL in Infektionsmedium eingestellt und je 300 µL dieser Suspension in Vertiefungen einer 24 Wellplatte gegeben. Die Zellen wurden für 30 min bei 24,5 °C inkubiert. Nachdem die Dictyostelien sedimentiert waren, wurde das Medium durch je 300 µL Infektionsmedium mit *L. pneumophila* Corby (MOI 0,5, MOI 2, MOI 5) ersetzt. Nach dreistündiger Inkubation bei 24,5 °C wurden die extrazellulären Bakterien durch Waschen mit 1 mL SP und Zugabe von 300 µL Infektionsmedium mit 100 µg/mL Gentamicin für 45 min bei 24,5 °C entfernt. Überschüssiges Gentamicin wurde durch zweimaliges Waschen mit SP entfernt. Die Zellen wurden mit 1 mL ddH_2O versetzt und durch Abkratzen mittels umgeknickter blauer Pipettenspitze sowie mehrmaliges Pipettieren vom Boden gelöst und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zentrifugation (12.000 x g, 7 min, RT) und starkes Vortexen (1 min). Zur Bestimmung der cfu/mL wurden geeignete Verdünnungen in ddH_2O hergestellt und je 20 µL auf eckigen BCYE-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für 3-4 Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Infektionsstudien

Für Infektionsstudien wurden die verwendeten Dictyostelien-Stämme auf 5×10^5 Zellen/mL in Infektionsmedium eingestellt und je 5 mL der Zellsuspension in eine 25 cm² Zellkulturflasche gegeben. Um Aufnahmeunterschiede der Stämme AX2, AGA5, AAG1, *atg9* sowie *atg9/cdcD* auszugleichen, wurde eine geringe MOI von 0,02 ohne Gentamicinbehandlung für die Infektion mit *L. pneumophila* Corby verwendet. Hierdurch sollte die Aufnahme aller Legionellen gewährleistet werden. Die Infektion erfolgte, wie für die Invasionsstudien beschrieben, bei 24,5 °C. Zu entsprechenden Zeitpunkten nach Infektion (3 h, 18 h, 24 h, 48 h und 72 h) wurden die Zellen durch Abklopfen vom Flaschenboden gelöst und 180 µL Aliquots pro Flasche in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zentrifugation (12.000 x g, 7 min, RT) und starkes Vortexen (1 min). Zur Bestimmung der cfu/mL wurden geeignete Verdünnungen in ddH₂O hergestellt und je 20 µL auf eckigen BCYE-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für 3-4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Infektion von *rpkA*⁻, 1E7 und 1D9 erfolgte mit *L. pneumophila* JR32 sowie avirulenten *L. pneumophila* JR32 *dotA*⁻ und *L. hackeliae* SG1 (MOI 10). Drei Stunden nach Infektion wurde eine Gentamicin-Behandlung mit 100 µg/mL für 45 min durchgeführt, um die extrazellulären Bakterien zu entfernen. Überschüssiges Gentamicin wurde durch zweimaliges Waschen mit SP entfernt und durch 5 mL frisches Infektionsmedium ersetzt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Infektion (3 h, 24 h, 34 h, 48 h, 72 h) wurden die Zellen durch Abklopfen vom Flaschenboden gelöst, 300 µL-Aliquots entnommen, wie oben beschrieben aufgeschlossen und in entsprechenden Verdünnungen auf BCYE-Agarplatten ausplattiert. Da ein starker Abbau der avirulenten Legionellen erfolgte, mussten 24-72 h nach Infektion 50 µL bzw. 100 µL der entsprechenden Verdünnungen auf ausplattiert werden, um die cfu/mL zu bestimmen.

4.8 Mikroskopie und Immunfluoreszenz

4.8.1 Rhodamin-Färbung von Bakterien

Der rot fluoreszierende Farbstoff Rhodamin lagert sich an Oberflächen von Bakterien an und wurde deshalb zur Färbung von Bakterien für Fluoreszenzmikroskopie-basierte Infektionsstudien eingesetzt. Bakterien wurden auf 1×10^9 Bakterien/mL in 1 x PBS pH 7,5 eingestellt und dreimal gewaschen (5000 x g, 2 min, RT). Zu 1 mL der Bakteriensuspension wurden 300 mM Rhodamin zugegeben und 30 min bei RT im Dunkeln rotiert. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert (5000 x g, 2 min, RT) und in 1 mL 50 mM Tris/HCl pH 7,5 gelöst um ungebundenes Rhodamin zu sättigen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis der Überstand farblos war. Danach wurden die Bakterien mit 1 x PBS gewaschen, um das Tris/HCl zu entfernen und danach in 1 x PBS aufgenommen. Ausgehend von dieser Suspension wurden erneut die Bakterienzahl/mL (OD_{600}) bestimmt und die benötigten Verdünnungen in Infektionsmedium hergestellt. Für Infektionsstudien mit *D. discoideum* wurden zusätzlich hitzeinaktivierte Legionellen (80 °C, 20 min) mit Rhodamin markiert.

4.8.2 Transmissionselektronen Mikroskopie

Transmissionselektronen Mikroskopie (TEM) wurde in dieser Arbeit einerseits zur Analyse der Wirkung von *B. pumilus*-Extrakt auf *Legionella* eingesetzt. Andererseits wurde sie dafür verwendet die Qualität von REV- und DAC-Liposomen sowie deren Bindung und Aufnahme in humane Zellen zu untersuchen.

Um die Wirkung von *B. pumilus*-Extrakt auf *L. pneumophila* Corby zu charakterisieren wurden die Bakterien auf 8×10^7 Zellen/mL in YEB-Medium eingestellt und je 1,5 mL in Vertiefungen einer 24-Wellplatte überführt. Die Legionellen wurden mit *B. pumilus*-Rohextrakt bzw. den Reinsubstanzen Pumilacidin A, C, E und dem neuen Peptidlacton über 24 h bzw. 48 h bei 37 °C inkubiert. Für jeden Probenzeitpunkt wurden entsprechende MeOH-Kontrollen sowie unbehandelte Kontrollen mitgeführt. Nach 24 h und 48 h wurden 700 µL

der Proben in 2 mL Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (14.000 x g, 5 min, RT) und die Bakterien in 2,5 % PFA für 30 min bei RT fixiert. Für die anschließende Betrachtung im TEM wurden die Zellen mit Uranylacetat (UAc) kontrastiert (Negativ Kontrastierung). Die Kontrastierung sowie Mikroskopie der Präparate erfolgte durch M. Rohde (HZI Braunschweig).

Die Größe und Intaktheit der Liposomen sowie die Bindung und Aufnahme über die humanen Zell-Linien U937 sowie NCI-H292 wurde ebenfalls im TEM untersucht. Hierzu wurden autoklavierte Deckgläschen in 24-Wellplatten platziert und je 500 µL einer auf 1×10^6 Zellen/mL eingestellten Zellsuspension in jedes Well gegeben. Die Kultur der jeweiligen Zell-Linie erfolgte entsprechend den Kapiteln 4.6.1 und 4.6.2. Nach erfolgreicher Differenzierung der Makrophagen und Adhärenz der Lungenepithelzellen erfolgte die Zugabe von 10 µL DAC-Liposomen (Gentamicinkonzentration gesamt 11,5 mg/mL) bzw. 40 µL REV-Liposomen (Gentamicinkonzentration gesamt 50 mg/mL) für 10, 30 und 60 Minuten bei 37 °C, 5 % CO₂. Es wurden jeweils Kontrollpräparate ohne Liposomen mitgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen und mit 2,5 % PFA fixiert. Die anschließende Bearbeitung der Präparate erfolgte durch M. Rohde (HZI Braunschweig).

4.8.3 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien wurde die Infektion von *D. discoideum* RpkA-GFP exprimierenden AX2, RpkA-HA (1E7, RpkA komplementiert) mit *L. pneumophila* JR32 untersucht. Weiterhin wurden Immunfluoreszenzstudien mit U937 Makrophagen durchgeführt, um die Lokalisation von Gm nach Aufnahme Gm-beladener Liposomen zu analysieren. Die hierfür verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 4.6 aufgelistet.

Immunfluoreszenzstudien mit *D. discoideum*

Als Vorbereitung wurden zunächst autoklavierte Deckgläschen in 24-Wellplatten platziert. Dictyostelien wurden auf 1×10^6 /mL in Infektionsmedium eingestellt und je 500 µL pro Deckgläschen ausgesät. Nach 30-minütiger Inkubation bei 24,5 °C waren die Zellen adhärent und konnten für

Infektionsstudien verwendet werden. Die Infektion erfolgte entweder mit hitzeinaktivierten, Rhodamin-markierten *L. pneumophila* JR32 (80 °C, 20 min) oder lebenden *L. pneumophila* JR32 (MOI 20). Das Medium in den Wells wurde durch das entsprechende Infektionsmedium ersetzt und die Infektion durch Zentrifugation (300 x g, 5 min) synchronisiert. Nach 10-minütiger Inkubation mit hitzeinaktivierten Legionellen sowie nach 3-stündiger Infektion mit lebenden Legionellen bei 24,5 °C wurde die Infektion gestoppt. Die Zellen wurden dreimal mit Soerensenpuffer gewaschen und für 25 min bei -20 °C mit MeOH fixiert. Das MeOH wurde abgenommen und die Zellen erneut dreimal mit Soerensenpuffer gewaschen. Die fixierten Präparate konnten entweder ü.N. in Puffer bei 4 °C aufbewahrt oder direkt für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet werden. War die Bearbeitung der Präparate innerhalb von 24 h nicht möglich oder sollten die Zellen verschickt werden, wurde das MeOH verdampft und die Zellen bei 4 °C aufbewahrt. Trockene Präparate konnten bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden und mussten vor den Immunfluoreszenzfärbungen rehydriert werden. Die Rehydrierung erfolgte durch Inkubation der Zellen (3 x 5 min) in PG (3,75 g Glyzin in 500 mL PBS pH 7,4). Rehydrierte sowie nicht rehydrierte Präparate wurden zweimal für je 15 min mit PBG (0,5 % BSA, 0,1 % Gelatine in 500 mL PBS pH 7,4) geblockt. In der Zwischenzeit wurden 1:3 Verdünnungen der primären AK gegen VatA (Maus) bzw. den HA-Tag (Ratte) in PBG hergestellt und 30-40 µL auf Parafilm pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten für 1 h bei RT auf den AK gegeben. Nach erfolgter Inkubation wurden die Deckgläschen zurück in die Wellschale transferiert und der Erstantikörper durch dreimaliges Waschen mit ca. 600 µL PBG entfernt. Die Sekundärantikörper Alexa 488 goat-anti-mouse IgG bzw. Alexa 568 goat anti-rat IgG wurden 1:1000 in PBG verdünnt und je 30-40 µL auf Parafilm getropft. Die Deckgläser wurden in den Tropfen überführt, 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert, dreimal mit PBG und dreimal mit PBS gewaschen. Zum Anfärben von DNA wurde DAPI (1 µg/mL) verwendet. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden die Präparate in 1 x PBS gewaschen und auf Objektträgern in einem Tropfen Dako-mounting medium eingebettet. Dieses härtet nach 5-6 h aus. Die weitere Lagerung erfolgte vor Licht geschützt bei 4 °C bzw. -20 °C. Die Immunfluoreszenzen mit *D. discoideum* wurden von T. Riyahi (Universität Köln) durchgeführt.

Immunfluoreszenz von Makrophagen

Makrophagen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS und 2 mM L-Gln und 10 mmol PMA auf 1×10^6 /mL eingestellt, je 500 μ L pro Deckgläschen ausgesät und über 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ ausdifferenziert. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation mit Gm-beladenen Liposomen (250 μ g/mL Gm). Im Anschluss wurden extrazelluläre Liposomen durch dreimaliges Waschen mit 1 mL 1 x PBS entfernt und die Zellen für 30 min in 3 % PFA bei RT fixiert. Durch dreimaliges Waschen mit PBS konnte das PFA entfernt werden. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte schonend durch Behandlung mit 0,5 % Saponin in PBS für 5 min bei RT. Der Erstantikörper gegen Gm (Kaninchen) wurde 1:200 in PBS verdünnt, auf Parafilm getropft und die Zellen für 1 h bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine 1:500 Verdünnung des Zweitantikörpers Alexa 488 goat-anti-rabbit in PBS hergestellt. Die Deckgläschen wurden erneut in PBS gewaschen, um den ersten Antikörper zu entfernen und auf Parafilm mit 40 μ L des Zweitantikörpers überführt. Nach Inkubation für 1 h bei RT im Dunkeln wurden die Deckgläser erneut in PBS gewaschen, die DNA mit DAPI gefärbt (s.o.) und die Präparate auf einen Objektträger mit einem Tropfen mounting medium (Dako) überführt. Nachdem das mounting medium ausgehärtet war, wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4 °C oder -20 °C aufbewahrt.

5 Ergebnisse

5.1 Rolle von PMNs in der Infektion mit *L. pneumophila*

Neutrophile Granulozyten stellen mit 60-75 % den größten Teil der im Blut zirkulierenden Leukozyten dar. Sie gehören zu den wichtigsten Zellen der unspezifischen Immunabwehr und wandern bei Infektionen schnell in das betroffene Gewebe ein. Pathogene Erreger werden von den PMNs phagozytiert und durch Fusion mit Granula, in denen sich mikrobizide Substanzen befinden, abgebaut. Sie spielen jedoch nicht nur als phagozytierende Zellen in den ersten Stadien der Infektion eine wichtige Rolle, sondern sind auch an einem weiteren Abwehrmechanismus des Immunsystems, der Ausbildung von NETs beteiligt. Im Gegensatz zu Makrophagen, deren Rolle in der *Legionella*-Infektion bereits intensiv erforscht wurde, ist das Wissen über die Funktion von PMNs sehr begrenzt. Ob und wie *Legionella* in die Regulation der PMN-Degradation eingreift, wurde zum einen in detaillierten Infektionsstudien über 4 h und zum anderen mittels qRT-PCR untersucht. Die Auswahl der Zielgene für die qRT-PCR erfolgte in Anlehnung an Proteomstudien mit *D. discoideum* und *L. pneumophila* (Shevchuck *et al.*, 2009, Urwyler *et al.*, 2009).

5.1.1 Infektionsstudien in humanen Lungenepithelzellen, Makrophagen-Zell-Linien sowie Makrophagen und PMNs aus humanem Blut

Für die Durchführung von qRT-PCR-Studien ist es entscheidend, die Infektionsbedingungen zu optimieren und zu standardisieren. Die Aufnahme von Legionellen in PMNs erfolgt nur nach vorheriger Opsonisierung mit Komplement und/oder AK, wobei die jeweiligen Opsonisierungsbedingungen stark von dem verwendeten *Legionella*-Stamm und der Serogruppe abhängen (Steffensen *et al.*, 1985). Aufgrund dieser Tatsache wurden zunächst die Opsonisierungsbedingungen für *L. pneumophila* Corby im Rahmen einer Bachelorarbeit ermittelt (Rebelein, 2010). Dazu wurde der Einfluss von humanem Serum (huS) mit Komplement im Vergleich zu fötalem Kälberserum (FCS) sowie die Zugabe von menschlichem Immuns serum bzw. polyklonalem *L. pneumophila* Antikörper (Lp-AK) auf die Infektion betrachtet. Zusätzlich wurden NCI-H292 Lungenepithelzellen, U937-Makrophagen und MΦ (frisch aus

dem Blut isolierte und zu Makrophagen differenzierte MNC) unter denselben Opsonisierungsbedingungen infiziert. Dies ermöglichte den direkten Vergleich von PMNs, Makrophagen und Lungenepithelzellen unter standardisierten Bedingungen. Der Infektionsverlauf wurde fluoreszenzmikroskopisch sowie mittels Infektionsassays ausgewertet.

In Abbildung 5.1 ist der Infektionsverlauf in den Zell-Linien NCI-H292, U937 sowie MΦ dargestellt. Die Aufnahme und Vermehrung der Legionellen in NCI-H292 erfolgte unabhängig von dem gewählten Serum bzw. AK. Im Vergleich mit einer Infektion in Makrophagen fiel die Aufnahmerate mit ca. $2 \times 10^3/\text{mL}$ um Faktor 250 geringer aus. Die Vermehrung über 24 h war mit 3,5 log-Stufen jedoch wesentlich stärker als bei den Makrophagen, in denen sich die Legionellen um ca. 1 log-Stufe vermehrten. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Infektion der Makrophagen-Zell-Linie und der frisch isolierten Makrophagen sehr ähnlich verläuft. Im Vergleich zur Infektion ohne AK wurde lediglich die Aufnahme in MΦ durch Zugabe von 1 % Lp-AK signifikant (t-Test) erhöht ($p = 0,001$ für FCS/Lp-AK; $p = 0,05$ für huS/ Lp-AK). Für U937 konnte kein Einfluss des AKs auf die Aufnahmerate festgestellt werden. Im Gegensatz zur Opsonisierung mit Lp-AK führte die Verwendung von humanem Immuns serum zu einer stark verminderten Replikationsrate der Legionellen über 24 h. Unter allen übrigen Infektionsbedingungen vermehrten sich die Legionellen hingegen um ca. 1 log-Stufe ($p = 0,001$).

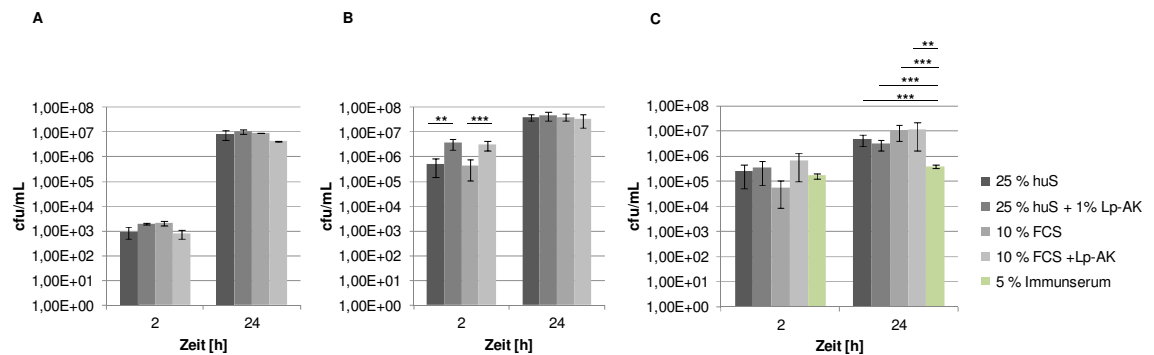


Abbildung 5.1: Infektion von humanen Zellen und Zell-Linien mit *L. pneumophila* Corby. Die Lungenepithel Zell-Linie NCI-H292 (A), humane Makrophagen MΦ (aus peripherem humanem Blut) (B) sowie die Makrophagen Zell-Linie U937 (C) wurden für 2 h mit *L. pneumophila* Corby MOI 10 infiziert. Nach 2 h und 24 h wurde die Aufnahmerate und Vermehrung bei unterschiedlichen Infektionsbedingungen (25 % huS mit bzw. ohne 1 % Lp-AK, 10 % FCS mit bzw. ohne 1 % Lp-AK) untersucht. Für U937 wurde zusätzlich eine Infektion in 5 % humanem Immunsersum durchgeführt. Die verschiedenen Opsonisierungsvarianten hatten keinen Einfluss auf die Aufnahme oder die Vermehrung von Legionellen in NCI-H292. In MΦ, nicht jedoch in U937, führte die Opsonisierung mit Lp-AK zu einer höheren Phagozytoserate. Im weiteren Infektionsverlauf waren keine deutlichen Unterschiede zwischen U937 und den MΦ zu erkennen. Die Zugabe von humanem Immunsersum inhibierte die Replikation in U937. * zeigen die *p*-Werte an. ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ (t-Test).

Zusätzlich wurde der Einfluss der AK-vermittelten Opsonisierung auf die Infektionsrate humaner Wirtszellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierfür wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät, mit GFP-Legionellen infiziert und nach 30 min mit PFA fixiert. Im Anschluss wurde die Anzahl infizierter Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Mikroskopische Aufnahmen nach 3-stündiger Infektion spiegelten die Ergebnisse aus den Infektionsassays für NCI-H292, U937 MΦ wieder. Im Unterschied zu den Lungenepithelzellen und Makrophagen, erfolgte die Aufnahme von Legionellen in PMNs ausschließlich in Anwesenheit von Lp-AK oder humanem Immunsersum (Mab 3/1). Durch die Zugabe von 1 % Lp-AK in Kombination mit 10 % FCS wurden über 90 % der Zellen infiziert. Die Verwendung von 25 % huS verringerte die benötigte AK-Konzentration auf 0,5 %. Bei Einsatz von 5 % humanem Immunsersum erfolgte ebenfalls eine gute Aufnahme durch die PMNs. Um standardisierte Infektionsbedingungen für anschließende qRT-PCR-Studien zu gewährleisten, wurden alle weiteren Infektionen mit 1 % Lp-AK und 10 % FCS durchgeführt.

Tabelle 5.1: Aufnahme­rate von *L. pneumophila* in PMNs, MΦ, U937 und NCI-H292 in Abhängigkeit von verschiedenen Opsonisierungsbedingungen (mikroskopische Auswertung).

	PMN	MΦ	U937	NCI-H292
25 % huS	- -	++	+	-
10 % FCS	- -	++	+	-
25 % huS + 1 % Lp-AK	++	++	++	-
25 % huS + 0,5 % Lp-AK	++	nt	nt	nt
10 % FCS + 1 % Lp-AK	++	++	++	-
5 % Immunserum (Mab 3/1)	++	nt	++	nt

Keine Aufnahme (- -); schlechte Aufnahme (-); befriedigende Aufnahme (+); gute Aufnahme (++); nicht getestet (nt)

Optimierung der Infektion von PMNs mit *L. pneumophila* Corby

PMNs besitzen ca. 10-fach weniger mRNA als z.B. Makrophagen oder Monozyten (Cassatella *et al.*, 1990). Aus diesem Grund wurde die Infektion aus dem 24-Wellformat auf 50 mL Röhrchen übertragen. Hierdurch konnte das Infektionsvolumen von 1 mL auf 5 mL erhöht werden. Durch die Rotation während der Infektion wurde außerdem der Blutstrom und dadurch das natürliche Milieu der PMNs simuliert. Außerdem konnte die vorherige Beschichtung von Wellplatten mit Poly-L-Lysin umgangen werden. Die Verwendung von Poly-L-Lysin ist für eine Infektion in Wellschalen essentiell, da PMNs nur schlecht an diese adhären. Beim Entfernen des Mediums lösten sich vor allem infizierte PMNs ab.

Zur weiteren Standardisierung der Infektionsbedingungen wurde die optimale MOI bestimmt. PMNs wurden mit rot fluoreszierenden *L. pneumophila* mcherry einer MOI 2, 5 und 10 infiziert und die Infektion *in vivo* am Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hierbei zeigte sich, dass bei MOI 2 ca. 5 % der PMNs infiziert wurden. MOI 5 führte zu einer 30%tigen und MOI 10 zu einer 90%igen Infektionsrate der PMNs, wobei ca. 3-10 Legionellen pro PMN aufgenommen wurden. Da MOI 2 keine ausreichende Infektion gewährleistete und MOI 10 bereits nach zehn Minuten zur Induktion von Apoptose (Bläschenbildung, deformierte Zellen) führte, wurde eine MOI von 5 für weitere Infektionsstudien eingesetzt. MOI 5 stellte einen Kompromiss zwischen der gewünschten Infektionsrate von 100 % und der unerwünschten Induktion von Apoptose dar.

Im Unterschied zu Makrophagen laufen die Phagozytose sowie der anschließende Abbau des Phagosomeninhalts in PMNs wesentlich schneller ab. Für PMNs ist bekannt, dass ein schneller Abbau von virulenten und avirulenten Legionellen in den ersten Stunden nach Infektion stattfindet. Bei virulenten Legionellen stagniert der Abbau schließlich und ein Teil der Legionellen überlebt. Im Vergleich dazu werden apathogene Bakterien, beispielsweise *E. coli* vollständig degradiert. (Horwitz & Silverstein 1981, Saha *et al.*, 1985, Lochner *et al.*, 1985, Rajagopalan-Levasseur *et al.*, 1992). Dies wirft die Frage auf, ob und wie virulente Legionellen regulierend in den Degradationsprozess der PMNs eingreifen. Um den richtigen Infektionszeitpunkt zu finden, wurden zunächst Infektionsstudien mit *L. pneumophila* Corby über 4 h durchgeführt. Als Vergleich dienten Infektionen mit apathogenen *E. coli* HB101. Der detaillierte Infektionsverlauf von PMNs mit *Legionella* sowie avirulenten *E. coli* HB101 über 4 h ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Legionellen sowie *E. coli* wurden innerhalb der ersten 35 min effektiv durch PMNs degradiert. Die Werte beziehen sich hierbei jeweils auf die Bakterienzahl zu Beginn der Infektion. Der Abbau von *Legionella* erfolgte in den ersten 15 min schneller als für *E. coli* und stagnierte nach 60 min bis zum Ende der Inkubationszeit von 4 h, wohingegen *E. coli* vollständig degradiert wurde.

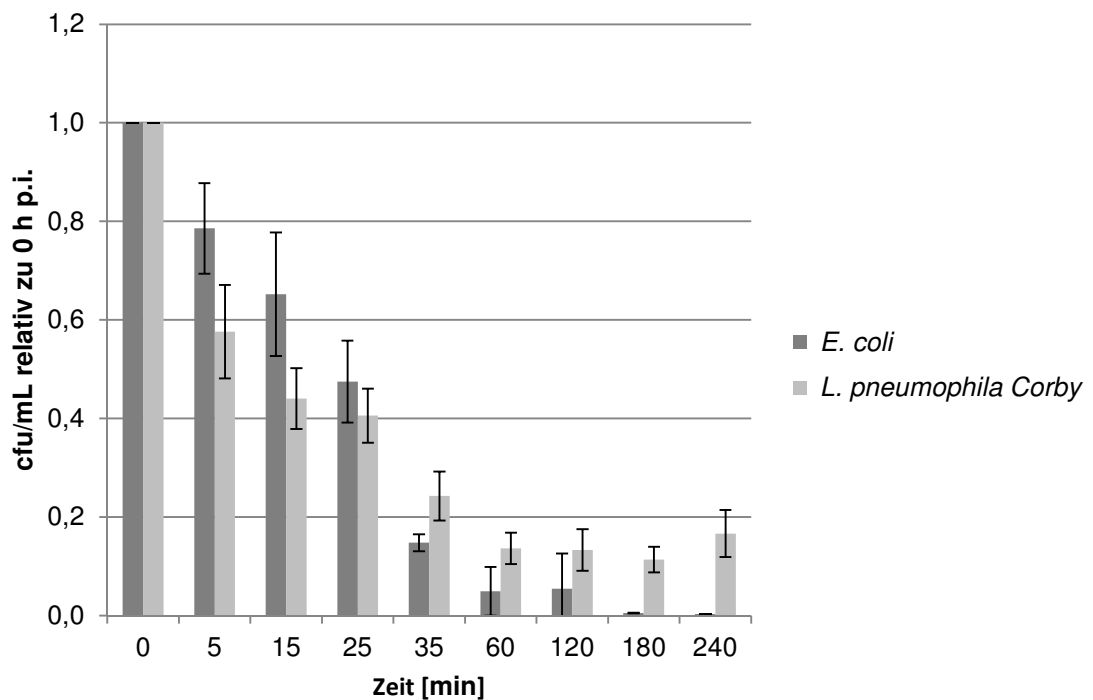


Abbildung 5.2: Infektionsstudien von humanen PMNs mit *L. pneumophila* Corby und *E. coli* HB101. Je 5 mL PMNs (1×10^6 /mL) wurden mit avirulenten *E. coli* HB101 (MOI5) bzw. mit zuvor mit 1 % Lp-AK opsonisierten *L. pneumophila* Corby (MOI 5) für 4 h unter Rotation bei 37 °C infiziert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die cfu/mL bestimmt. Diese wurde auf die ursprünglich eingesetzte Bakterienzahl bezogen. Beide Bakterienstämme wurden konstant bis 35 min nach Infektion durch die PMNs abgebaut. Der Abbau von *Legionella* stagnierte nach 60 min bis zum Ende der Inkubationszeit von 4 h, wohingegen *E. coli* nahezu vollständig degradiert wurde. Die Versuche wurden zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Da es nach einem zunächst schnellen Abbau von *Legionella* in den ersten 60 min zu einer Stagnation des Abbaus kommt, wurden frühe Infektionszeitpunkte (5, 10 und 20 min) für qRT-PCR-Studien gewählt. Es wurde davon ausgegangen, dass *Legionella* innerhalb dieses Zeitfensters in die Regulation der PMNs eingreift, um einen weiteren Abbau durch die Leukozyten zu verhindern.

5.1.2 qRT-PCR-Studien zur Analyse spezifischer Wirtsgene während der *Legionella*-Infektion von PMNs

Um globale Änderungen der Genregulation in PMNs nach Infektion mit *L. pneumophila* Corby zu untersuchen, beschränkten sich die Versuche dieser Arbeit zunächst auf den Vergleich ausgewählter Zielgene zwischen nicht infizierten und mit *L. pneumophila* Corby infizierten PMNs. Für die Auswahl der

Gene wurden vergleichende Proteomstudien herangezogen, die im Modellorganismus *D. discoideum* durchgeführt wurden. Von besonderem Interesse waren hierbei Gene, deren Proteine verstärkt oder vermindert nach 2-, 4- oder 6-stündiger Infektion mit *L. pneumophila* im Vergleich zu avirulenten *L. hackeliae* auftraten (s. Tabelle 5.2). Hierzu zählen der putative protein Kinase C Inhibitor FttB, das cell division protein CdcD, der Rho GDP dissociation Inhibitor RdiA, die Aspartyl-tRNA-Synthetase AspS1, die Superoxid Dismutase SodA, die Catalase CatA und der Elongationsfaktor EfbA (Shevchuck *et al.*, 2009, Urwyler *et al.*, 2009). Cdc42 gehört zur Familie der Rho GTPasen und ist an vielfältigen Signaltransduktionswegen nach der Rezeptor-vermittelten Phagozytose beteiligt. Die kleine GTPase steuert u.a. die Fusion von Granula mit bakterienhaltigen Phagosomen (Zhong *et al.*, 2003) und wurde deshalb ebenfalls ausgewählt. Aktivierte Rho-Proteine regulieren u.a. die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, ROS Produktion, Apoptose, Zellzyklus, Genexpression. Als Positivkontrolle diente IL-1 β , da dieses verstärkt von PMNs nach Inkubation mit *E. coli* K12, LPS oder fMLP exprimiert wurde (Zhang *et al.*, 2004).

Tabelle 5.2: Ausgewählte Zielgene für qRT-PCR-Studien in PMNs. Die Auswahl der Zielgene erfolgte anhand von Proteomstudien mit *D. discoideum* und *L. pneumophila*. Dargestellt sind die Genbezeichnungen in *Dictyostelium* und das entsprechende Homolog im Menschen.

Zielgen	Homolog im Menschen	Klasse	Primäre Funktion	Referenz
FttB	FttB	putativer Protein Kinase C Inhibitor	Signaltransduktion (Zellteilung)	Shevchuck <i>et al.</i> , 2009
CdcD	VCP	AAA-ATPase	Signaltransduktion (Vesikeltransport, Zellzyklus, UPS, ERAD, Autophagie)	Shevchuck <i>et al.</i> , 2009
RdiA	Rho GDI I	Inhibitor von Rho-Proteinen	Signaltransduktion	Shevchuck <i>et al.</i> , 2009, Urwyler <i>et al.</i> , 2009
AspS1	DARS	Aspartyl-tRNA Synthetase	Proteinbiosynthese	Shevchuck <i>et al.</i> , 2009
EfbA	EEF2	Elongationsfaktor	Proteinbiosynthese	Shevchuck <i>et al.</i> , 2009
SodA	SOD1	Superoxid Dismutase	Stress-Antwort (Abbau von O ₂ ⁻ zu H ₂ O ₂)	Shevchuck <i>et al.</i> , 2009
CatA	CAT	Catalase	Stress-Antwort (Abbau von H ₂ O ₂)	Shevchuck <i>et al.</i> , 2009
Cdc42	Cdc42	Rho GTPase	Signaltransduktion (Zellzyklus, Endozytose)	Zhong <i>et al.</i> , 2003
	IL-1 β	Zytokin	Signaltransduktion (Entzündungsreaktion)	Zhang <i>et al.</i> , 2004

Optimierung der RNA-Isolation

Die RNA-Isolation und Aufreinigung erfolgte wie unter Abschnitt 4.5.4 beschrieben. Aus 56 mL Vollblut konnten ca. 7×10^7 PMNs gewonnen werden. Zu Beginn der Arbeit wurde Trizol zur RNA-Isolation verwendet. Dieses Verfahren lieferte mit 1-1,8 μg RNA pro $2,5 \times 10^7$ PMNs jedoch wesentlich geringere Ausbeuten als die optimierte Aufreinigung unter Verwendung des Kits der Firma M&N. Der Zellaufschluss über Injektionskanülen und Shreddersäulen sowie die Erhöhung der eingesetzten Zellzahl pro Säule auf $2,5 \times 10^7$ PMNs an Stelle von 5×10^6 PMNs konnte die Ausbeute auf insgesamt 3-3,4 μg Gesamt-RNA pro $2,5 \times 10^7$ PMNs steigern. Nach erfolgter Isolation wurde die Integrität der RNA gelelektrophoretisch im Bioanalyzer (Agilent Technologies) untersucht. Die zugehörige Software berechnet mittels eines Algorithmus das Verhältnis der verschiedenen RNAs einer Probe und darüber die „RNA integrity number“ (RIN). Ein repräsentatives Ergebnis für RNA-Proben aus infizierten und nicht infizierten PMNs ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Zu sehen sind Banden für die 28 S rRNA (obere Bande) und 18 S rRNA (untere Bande). Ein RIN-Wert von 10 stellt die maximale RNA-Integrität und ein Wert von 1 stellt stark degradierte RNA dar. Für weiterführende qRT-PCR-Studien wurden ausschließlich Proben mit einem RIN-Wert von 8-8,9 verwendet.

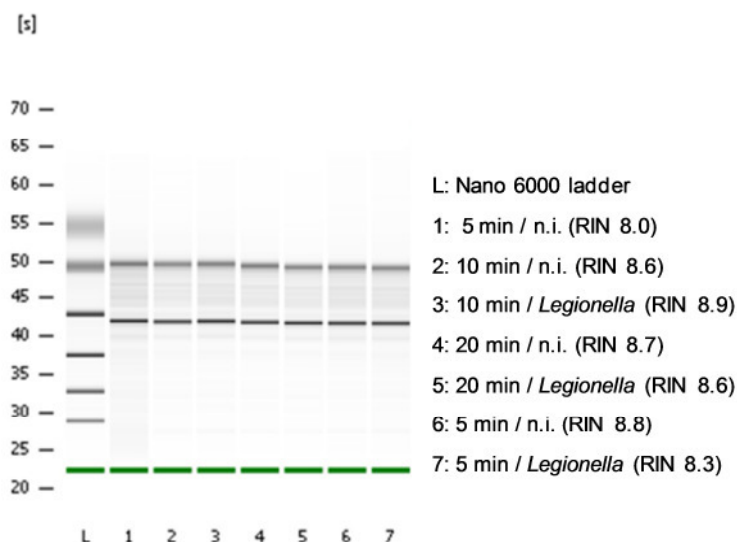


Abbildung 5.3: Gelelektrophoretische Bestimmung der RNA-Integrität von PMNs mittels Bioanalyzer. Nach erfolgter RNA Isolation aus humanen PMNs wurde die Integrität der RNA mittels Bioanalyzer (Agilent Technologies) bestimmt. Ein RIN-Wert von 10 stellt hierbei die höchstmögliche Integrität dar. Dargestellt ist ein repräsentatives Gel von RNA aus mit *L. pneumophila* Corby infizierten PMNs und den nicht infizierten (n.i.) Kontrollzellen 5, 10 und 20 min nach Infektion. Die zwei Banden im Gel repräsentieren die eukaryotische 18 S rRNA (untere Bande) und 28 S rRNA (obere Bande).

Die isolierte RNA wurde zur Synthese von cDNA eingesetzt. Die Optimierung der qRT-PCR erfolgte unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs EvaGreen. Zunächst wurden cDNA-Konzentrationen von 10 ng/μL, 50 ng/μL, 100 ng/μL und 500 ng/μL in der PCR eingesetzt. Im Vergleich der Schmelzkurven sowie der erreichten C_T-Werte zur Wasserkontrolle lieferten 100 ng/μL cDNA die besten Resultate. Das bedeutet, dass die Schmelzkurven keine Doppelpeaks aufwiesen, die C_T-Werte 5 Zyklen mit der Wasserkontrolle auseinander lagen und das gewünschte Amplifikat im Kontrollgel als eine Bande sichtbar war. Geringere cDNA-Konzentrationen führten zu sehr späten C_T-Werten, die nur knapp unter denen der Wasserkontrolle lagen und konnten deshalb nicht eingesetzt werden.

Um die Regulation von Zielgenen vergleichen zu können, müssen zunächst Referenzgene zur Normalisierung bestimmt werden. Referenzgene zeichnen sich dadurch aus, dass sie unter allen verwendeten Bedingungen stabil exprimiert werden können. Hierfür wurde eine RT-PCR mit GAPDH, HRPT1, RPL32, RPL32A, B2M durchgeführt und über GeNorm ausgewertet (Vandesompele *et al.*, 2002). Für PMNs wurden in der Reihenfolge HRPT1, RPL32 sowie B2M als stabilste Gene ermittelt. HRPT1 sowie RPL32 wurden daher als Referenzgene für alle weiteren qRT-PCR-Studien eingesetzt. Im Folgenden konnten die Expressionslevel der zu untersuchenden Gene *IL-1β*, *gdi*, *vcp*, *eef2* und *cdc42* in Relation zu den gewählten Referenzgenen gesetzt werden. Hierbei wurden infizierte und nichtinfizierte PMNs der Zeitpunkte 5 min, 10 min und 20 min in Bezug auf nicht infizierte Zellen zum Zeitpunkt 5 min betrachtet. Die Auswertung der in der qRT-PCR erhaltenen Rohdaten erfolgte über ein modifiziertes R-Packet (Ritz und Spiess, 2008) nach dem sigmoidalen Modell (modifiziert von R. Münch, TU Braunschweig). Ab einem Faktor ≥ 2 zwischen zwei Proben wurde ein Gen als unterschiedlich reguliert betrachtet. Abbildung 5.4 zeigt das Ergebnis zweier qRT-PCRs von infizierten PMNs (*L. pneumophila* Corby MOI 5) im Vergleich zu nicht infizierten PMNs 5, 10 und 20 min nach Infektion.

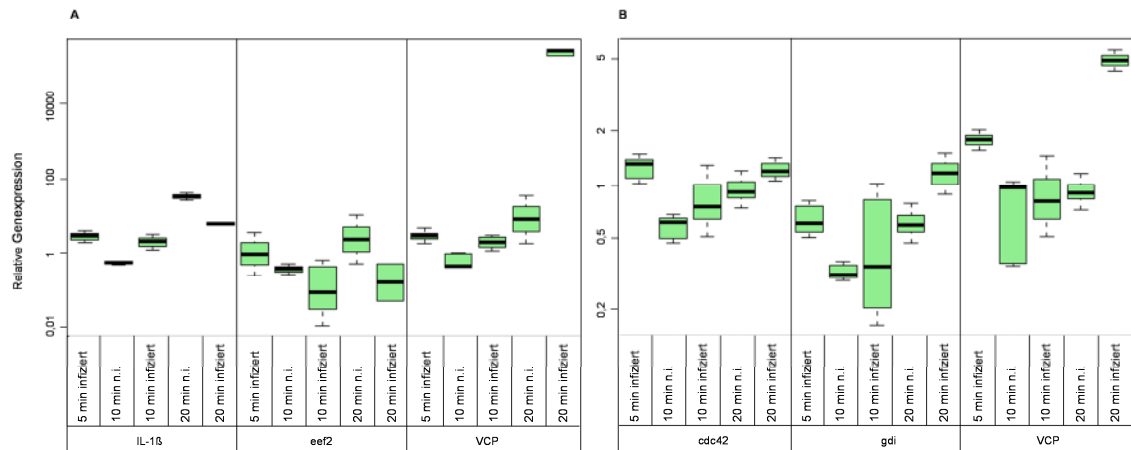


Abbildung 5.4: Box-Plot einer qRT-PCR von PMNs nach Infektion mit *L. pneumophila* Corby. Dargestellt ist die relative Genexpression ausgewählter Gene von infizierten (MOI 5) und nicht infizierten PMNs zu den Zeitpunkten 5, 10 und 20 min, bezogen auf nicht infizierte Zellen zum Zeitpunkt 5 min. Die Expressionslevel der Gene *IL-1β*, *eef2*, *vcp* (A) und *cdc42*, *gdi* und *vcp* (B) wurden normalisiert zu den Referenzgenen *HRPT1* und *RPL32* betrachtet. Die Auswertung der in der qRT-PCR erhaltenen Rohdaten erfolgte über ein modifiziertes R-Packet (Ritz und Spiess, 2008) nach dem sigmoidalen Modell (modifiziert von R. Münch, TU Braunschweig). Von den betrachteten Genen wurde nur *vcp* im Vergleich mit nicht infizierten Zellen 20 min nach Infektion differenziell hoch reguliert. Für die Analysen in A und B wurde cDNA aus derselben Ausgangs-RNA synthetisiert.

Hierbei fiel auf, dass innerhalb der ersten 10 min keines der betrachteten Gene differenziell reguliert wurde. *Vcp* wurde als einziges Gen 20 min nach Infektion hochreguliert. Insgesamt kann jedoch keine endgültige Aussage über die Regulation getroffen werden, da die Ergebnisse zwischen unterschiedlichen PCR-Ansätzen derselben RNA erheblich voneinander abweichen (s. Abbildung 5.4 A und B). In A unterscheiden sich die Expressionslevel von *vcp* infiziert zu nicht infiziert um Faktor 100, in B nur um Faktor 5. Wegen der widersprüchlichen Ergebnisse und anderer Prioritäten wurden keine weiteren Versuche mit SOD1, CAT und DARS durchgeführt.

5.1.3 Die Rolle von NETs in der Infektion mit *L. pneumophila*

Neben ihrer phagozytischen Aktivität können neutrophile Granulozyten durch die Bildung von NETs die Verbreitung bakterieller Erreger unterbinden. Zur Bestimmung der Rolle von NETs während der *Legionella*-Infektion wurde als erstes die Induktion von NETs fluoreszenzmikroskopisch mittels DAPI-Färbung der Präparate untersucht. Um eine ungewollte Induktion von NETs zu verhindern, war es wichtig, die Zellen möglichst wenig Stressfaktoren auszusetzen (z.B. Waschschrte, Temperaturwechsel etc.). Dies wurde durch

die direkte Zugabe von Bakterien bzw. PMA oder Cytochalasin D (cytD) zu den PMNs erreicht und durch die Verwendung von RPMI 1640 ohne Phenolrot. Das Medium besitzt keine Eigenfluoreszenz und konnte daher direkt für die Fixierung der PMNs mit PFA eingesetzt werden. Durch Verwendung geeigneter Positiv- und Negativkontrollen wurde schließlich die NET-Induktion durch *L. pneumophila* Corby mit und ohne vorherige Opsonisierung mit 1 % Lp-AK untersucht. Um auszuschließen, dass *Legionella* Nukleasen produziert, die durch Degradation der freigesetzten DNA eine Bildung von NETs verhindern würden, wurden außerdem Kulturüberstände stationärer Legionellen auf Nuklease-Aktivität untersucht. Die Analyse erfolgte mittels Nuklease-Agar (Difco) und ergab negative Ergebnisse für die getesteten Kulturüberstände. Als Positivkontrolle wurde DNase I eingesetzt (s. Abbildung 5.5).

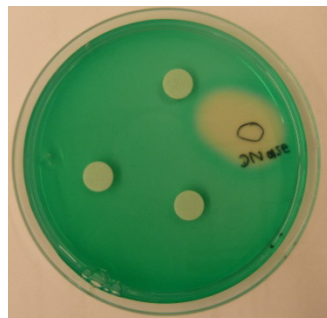


Abbildung 5.5: DNase-Test von stationären *L. pneumophila*-Kulturen. *L. pneumophila*-Kulturüberstände zeigten keine DNase-Aktivität auf Nuklease-Agar (Difco) an. Als Positivkontrolle diente DNase I. Diese rief eine deutliche Entfärbung des Agars hervor.

Unbehandelte Zellen bilden keine NETs und dienten als Negativkontrollen für den jeweiligen Versuchszeitpunkt. Die Inkubation von PMNs mit 25 nM bzw. 50 nM PMA führte zur Degranulation des Zellkerns sowie zur Ausbildung von NETs (s. Abbildung 5.6 A). Um die grundsätzliche Vitalität der PMNs zu überprüfen, wurden diese mit *E. coli* DH5α-GFP bzw. mit 1 % Lp-AK opsonisierten *L. pneumophila* mcherry inkubiert. Waren die Zellen „gesund“, erfolgte die sofortige Phagozytose der Bakterien.

Die Induktion von NETs durch Bakterien kann untersucht werden, indem die Zellen 30 min vor Zugabe der Bakterien mit dem Phagozytoseinhibitor cytD inkubiert werden. Es ist bekannt, dass cytD keinen Einfluss auf die NET-Bildung hat (Brinkmann *et al.*, 2004). Um dies zu überprüfen erfolgte die anschließende Inkubation der PMNs mit *E. coli* sowie opsonisierten und nicht opsonisierten

Legionellen für 2-3 h. *E. coli* induzierte die Bildung von NETs, wohingegen Legionellen, unabhängig von der Opsonisierung, keine NET-Bildung auslösten.

Um endgültig auszuschließen, dass *Legionella*-DNasen die Bildung von NETs verhindern, wurden NETs mittels PMA induziert und anschließend *L. pneumophila* bzw. *E. coli* für maximal 2 h hinzugegeben. Beide Bakterien blieben in den NET-Strukturen hängen. Es konnte kein Abbau der induzierten NETs beobachtet werden (Abbildung 5.6 B und C).

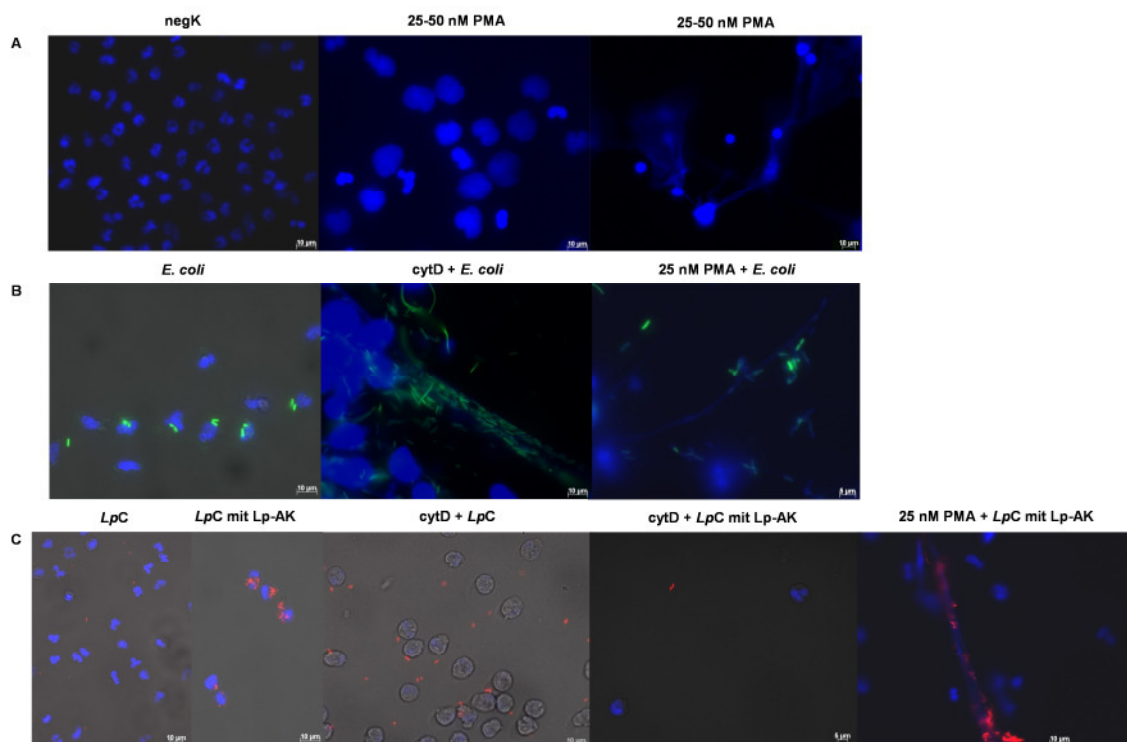


Abbildung 5.6: Induktion von NETs in humanen PMNs. Die Visualisierung von NETs und der Zellkerne erfolgte mittels DAPI (blau). Für jeden Versuchsansatz wurden unbehandelte Zellen als Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle wurden 25-50 nM PMA für 2 h zu den Zellen gegeben. Dies führte zur Degranulation der Zellkerne und NET-Bildung (**A**). PMNs wurden außerdem mit *E. coli*-GFP (grün) einer MOI 10 inkubiert um die Aufnahmefähigkeit der Zellen zu überprüfen. Durch 30-minütige Zugabe von 10 µg/mL cytD wurde die Phagozytose der PMNs inhibiert und diese anschließend für 2-3 h mit *E. coli* inkubiert. Dies führte ebenfalls zur Ausbildung von NETs, in denen die Bakterien hängen blieben. Zusätzlich wurde das Vorhandensein von DNasen überprüft, indem NETs zunächst mit PMA induziert wurden und anschließend *E. coli* für 1-2 h hinzugegeben wurden. Die Bakterien blieben in den NET-Strukturen hängen und es konnte keine Degradation der DNA beobachtet werden (**B**). Um die Induktion von NETs durch *L. pneumophila* Corby mcherry (rot) zu überprüfen, wurde wie für *E. coli* vorgegangen. Zusätzlich wurden Legionellen mit 1 % Lp-AK opsonisiert. Nur opsonisierte Legionellen wurden von PMNs aufgenommen. Unabhängig vom Opsonisierungszustand waren die Legionellen nicht in der Lage die Bildung von NETs zu induzieren. Sowohl opsonisierte als auch nicht opsonisierte Legionellen blieben in NET-Strukturen hängen, die zuvor durch PMA induziert wurden. Es erfolgte kein Abbau der NET-Strukturen durch die Co-Inkubation mit *Legionella* für 3 h (**C**).

Zusammenfassung

Vergleichende Infektionsstudien mit *L. pneumophila* Corby in PMNs, MΦ, U937 und NCI-H292 zeigten, dass die vorherige Opsonisierung mit Lp-AK essentiell für eine Aufnahme von Legionellen in PMNs ist. Makrophagen und Lungenepithelzellen waren hingegen auch ohne vorherige Opsonisierung mit *Legionella*-Antikörpern in der Lage, die Bakterien zu phagozytieren. Im Gegensatz zu Makrophagen und Lungenepithelzellen erfolgte keine bakterielle Vermehrung in den Leukozyten. Stattdessen wurde ein Großteil der Legionellen während der ersten 60 min nach Infektion abgebaut. Der Abbau stagnierte schließlich, wohingegen avirulente *E. coli* HB101 nach 4 h vollständig degradiert wurden. Erste Ergebnisse einer qRT-PCR-Studie zwischen infizierten und nicht infizierten PMNs deuten darauf hin, dass *L. pneumophila* in die Genregulation von PMNs eingreift. So wurde *vcp* nach 20-minütiger Infektion differenziell in infizierten Zellen hoch reguliert.

Anhand von fluoreszenzmikroskopischen Studien wurde außerdem gezeigt, dass *L. pneumophila* Corby unabhängig vom Opsonisierungszustand nicht in der Lage ist NETs in PMNs zu induzieren. Waren bereits NET-Strukturen vorhanden, blieben Legionellen in diesen hängen. Ein Abbau der DNA über *Legionella*-eigene Nukleasen wurde nicht beobachtet. Dies wurde zusätzlich durch einen Test von *Legionella*-Kulturübertänden auf Nukleaseagar bestätigt. In Positivkontrollen mit *E. coli* sowie PMA konnten NETs erfolgreich in den humanen PMNs induziert werden. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle und wiesen keine NET-Bildung oder Degranulation der Zellkerne auf.

5.2 *Dictyostelium discoideum* als Wirtsmodellorganismus

D. discoideum besitzt eine hohe Ähnlichkeit zu humanen Makrophagen, auf zellulärer Ebene sowie hinsichtlich der Reaktion nach einer Infektion mit Legionellen. In der vorliegenden Arbeit wurden drei *D. discoideum*-Mutanten untersucht, um einen besseren Einblick in die Interaktion von *Legionella* mit dem Phosphatidylinositolmetabolismus der Wirtszelle sowie dem Autophagieprozess zu gewinnen. Von besonderem Interesse waren dabei die

Rezeptor Phosphatidylinositol Kinase A (RpkA) sowie zwei an der Autophagie beteiligte Proteine, Atg9 und CdcD.

5.2.1 Die Rolle von RpkA in der *Legionella*-Infektion

RpkA aus *D. discoideum* besteht aus einem G-Protein gekoppelten Rezeptor am Aminoterminal und einer vorhergesagten Phosphatidylinositol 4-Phosphat-5-Kinase (PI4P5K) am Carboxyterminal. RpkA wird während des gesamten Wachstums von *D. discoideum* exprimiert und ist an endosomalen Membranen (späten Endosomen, reifenden Phagosomen, Lysosomen) lokalisiert. Im Gegensatz zu anderen PI4P5K, die sich hauptsächlich an der Plasmamembran befinden, wird RpkA dort nicht beobachtet und ist nicht an der Bildung des „phagocytic cup“ bei Phagosomen beteiligt (Bakthavatsalam *et al.*, 2007). RpkA kolokalisiert mit VatA, einer Untereinheit der V-H⁺-ATPase und wird mit ähnlichen Kinetiken an Phagosomen angelagert. Ungefähr 60 Sekunden nach Phagozytose von TRITC-markierter Hefe, fusionieren RpkA-haltige Vesikel mit der phagosomalen Membran. Die Deletionsmutante *rpkA*⁻ zeigt eine gestörte Fruchtkörperbildung sowie eine verminderte Aufnahmerate von *S. cerevisiae*. Weiterhin besitzt die Deletionsmutante einen veränderten PI-Haushalt, da sie verringerte Level an PIP- und PIP2-Derivaten aufweist (Riyahi *et al.*, 2011). Phosphoinositide besitzen eine Schlüsselfunktion für die Regulation diverser zellulärer Prozesse wie der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion, der Aktin-Zytoskelett-Modulation oder dem Membran-Trafficking (DeMatteis & Godi, 2004). Die zeitliche und örtliche Produktion bestimmter Phosphoinositide muss daher strikt reguliert werden. Dies geschieht über das Zusammenspiel von Kinasen, Phosphatasen, Phospholipasen mit kleinen GTPasen und anderen Effektorproteinen. Intrazelluläre Pathogene interferieren mit dem PI-Metabolismus um ihre Aufnahme, die Bildung replikativer Vakuolen oder die Apoptose zu modulieren (Hilbi, 2006).

Legionella besitzt ein Typ IVB SS mit mehr als 300 Effektor-Proteinen, die in die Wirtszelle injiziert werden (Hubber & Roy, 2010, Viner *et al.*, 2012). Dies ermöglicht *Legionella* die Etablierung einer replikativen Nische, wobei die Fusion des Phagosoms mit Endosomen verhindert und die Rekrutierung früher sekretorischer Vesikel gefördert wird (Kagan & Roy, 2002, Robinson & Roy,

2006). Effektor-Proteine wie SidC (Weber *et al.*, 2006), SidM/DrrA (Machner & Isberg, 2006, Murata *et al.*, 2006) und RaIF (Nagai *et al.*, 2002) interagieren mit Phosphoinositiden oder anderen Wirtsproteinen und sind an der Modulation des Vesikeltransports und damit an der Etablierung der replikativen Nische und Modulation der *Legionella*-haltigen Vakuole (LCV) beteiligt.

Aufgrund der Rolle von RpkA in der Phagozytose im PI-Haushalt sowie seiner Kolokalisation mit der V-H⁺-ATPase, einem wichtigen Marker reifer Endosomen, war es von Interesse die Auswirkung der Deletion des *rpkA*⁻-Gens auf die Infektion mit *Legionella* zu untersuchen. Hierfür wurden RpkA-GFP exprimierende AX2-Zellen mit hitzeinaktivierten, Rhodamin-markierten *L. pneumophila* JR32 inkubiert. Bereits nach 10 min kolokalisierte RpkA mit der LCV (Abbildung 5.7 A). Weiterhin wurden *rpkA*⁻-Zellen, welche RpkA-HA (rescue strain 1E7) exprimieren, mit lebenden *L. pneumophila* JR32 infiziert. Nach 1-stündiger Infektion konnten RpkA sowie VatA, eine Untereinheit der V-H⁺-ATPase, an der LCV nachgewiesen werden (Abbildung 5.7 B).

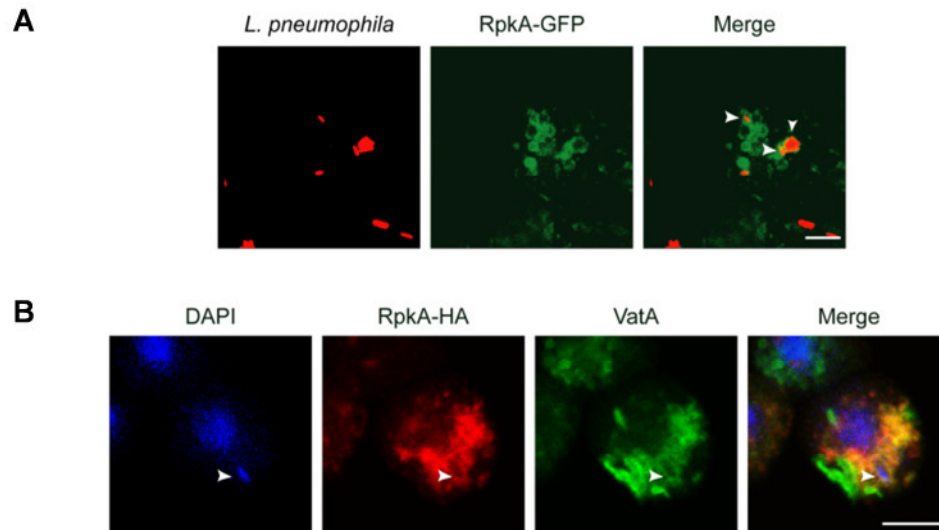


Abbildung 5.7: Fluoreszenzmikroskopie: Infektion von *D. discoideum rpkA*⁻ mit *L. pneumophila* JR32. (A) RpkA-GFP exprimierende AX2-Zellen wurden für 10 min mit hitzeinaktivierten, Rhodamin-markierten Legionellen inkubiert und in MeOH fixiert. Der Pfeil markiert ein Bakterium (rot), welches von RpkA-markierter Membran (grün) umschlossen wurde **(B)**. *RpkA*⁻-Zellen, welche RpkA-HA (rescue strain 1E7) exprimieren, wurden eine Stunde mit lebenden Legionellen inkubiert und fixiert. Die Visualisierung der Bakterien erfolgte mittels DAPI (blau). Über Immunfluoreszenz wurde RpkA-HA (rot), VatA (grün) visualisiert. Der Pfeil markiert eine *Legionella*-haltige Vakuole, die positiv für die V-H⁺-ATPase sowie RpkA-HA ist. Maßstab 5 µm.

Um die Rolle von RpkA in der *Legionella*-Infektion zu analysieren, wurden Infektionsstudien mit *L. pneumophila* JR32 sowie mit avirulenten *L. hackeliae* und *L. pneumophila* JR32 *dotA*⁻ in *D. discoideum* AX2, seiner isogenen *rpka*⁻-Mutante sowie den Komplementanten 1E7 und 1D9 durchgeführt. Die Anzucht der Dictyostelien erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen bei 21 °C, da sich *rpka*⁻ nicht bei 25 °C in Schüttelkultur kultivieren ließ. Infektionen von *rpka*⁻ mit virulenten *L. pneumophila* JR32 zeigten einen signifikanten Anstieg (t-Test) der Vermehrung nach 48 h ($p \leq 0,01$) sowie nach 72 h ($p \leq 0,001$) im Vergleich zum Wildtyp AX2. *Legionella* vermehrte sich ca. 12-fach besser in der Deletionsmutante. Die Komplementanten 1E7 und 1D9 zeigten im Allgemeinen einen wildtypischen Infektionsverlauf. Auffällig war allerdings die starke Abnahme von *Legionella* in 1E7 nach 24-stündiger Infektion. Die verwendeten *Dictyostelium*-Stämme wiesen keinen Unterschied in der Aufnahmerate für *Legionella* auf (Abbildung 5.8).

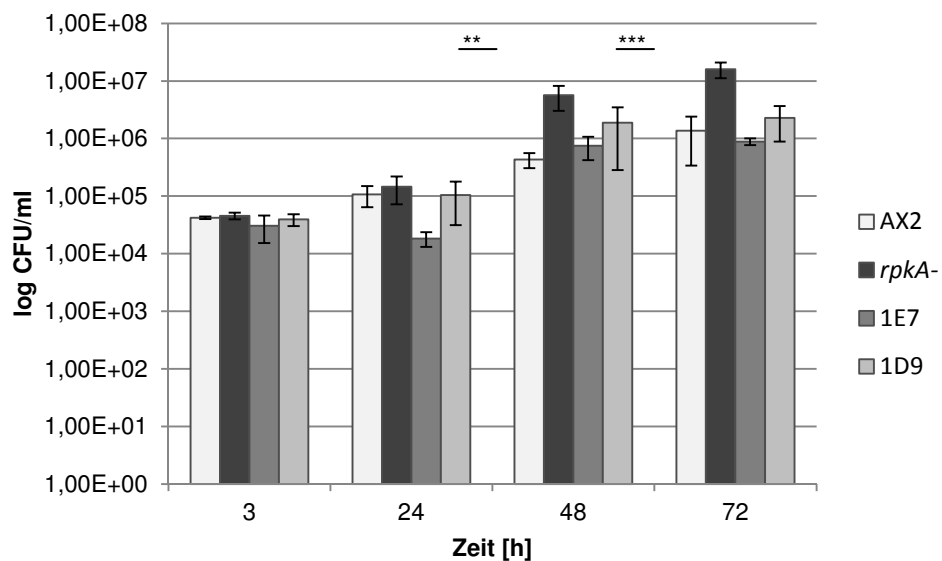


Abbildung 5.8: Infektionsstudien mit *L. pneumophila* JR32 in der *D. discoideum* Deletionsmutante Mutante *rpka*⁻. *D. discoideum* AX2, die Deletionsmutante *rpka*⁻ sowie die beiden Komplementanten 1E7 und 1D9 wurden für 3 h mit *L. pneumophila* JR32 infiziert (MOI 10). Die Vermehrung von *L. pneumophila* in der Deletionsmutante *rpka*⁻ ist nach 48 h ($p \leq 0,01$) und nach 72 h ($p \leq 0,001$) ca. 12-fach höher als im Wildtyp AX2. In den Komplementanten 1E7 und 1D9 verläuft die Infektion vergleichbar zum Wildtyp AX2. Der Graph gibt Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten in Triplikaten an. * zeigen die *p*-Werte an. ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ (t-Test).

Um den Einfluss des Typ IVB SS Systems während der Infektion zu untersuchen, wurden Infektionsstudien mit avirulenten *L. hackeliae* sowie *L. pneumophila* JR32 *dotA*⁻ durchgeführt. Der Abbau beider *Legionella*-Stämme erfolgte in *rpkA*⁻ signifikant langsamer als im Wildtyp (Abbildung 5.9).

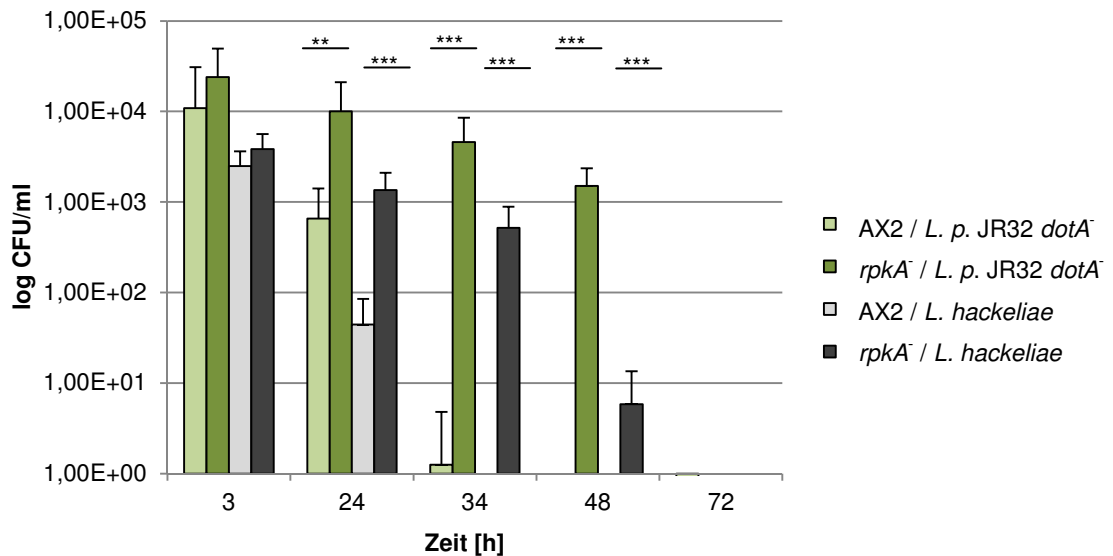


Abbildung 5.9: Infektionsstudien mit *L. hackeliae* und *L. pneumophila* JR32 *dotA*⁻ in der *D. discoideum* Deletionsmutante *rpkA*⁻. *D. discoideum* AX2 und die Deletionsmutante *rpkA*⁻ wurden für 3 h mit *L. hackeliae* bzw. *L. pneumophila* JR32 *dotA*⁻ infiziert (MOI 10). Die Aufnahme rate von *L. hackeliae* ist gegenüber *L. pneumophila* JR32 *dotA*⁻ im Wildtyp AX2 sowie *rpkA*⁻ ca. 5-fach verringert. Beide *Legionella*-Stämme werden im Wildtyp AX2 im Verlauf von 48 h schneller abgebaut als in der Deletionsmutante *rpkA*⁻ ($p \leq 0,001$). Der Graph gibt Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten in Triplikaten an. * zeigen die p -Werte an. ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ (t-Test).

Ein Vergleich zwischen AX2 und *rpkA*⁻ zeigt, dass im Wildtyp bereits nach 24 h 98 % der *L. hackeliae* bzw. 93 % von *L. pneumophila* JR32 *dotA*⁻ abgebaut wurden. In *rpkA*⁻ erfolgte der Abbau mit 65 % bzw. 53 % nach 24 h wesentlich langsamer. Beiden *Dictyostelium*-Stämmen gemeinsam ist der schnellere Abbau von *L. hackeliae* im Vergleich zu *L. pneumophila* JR32 *dotA*⁻ sowie der vollständige Abbau nach 72 h (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3: Prozentualer Abbau von *L. hackeliae* und *L. pneumophila* JR32 *dotA*⁻ in AX2 und *rpkA*⁻ über 72 h.

Zeit [h]	AX2	<i>rpkA</i> ⁻	AX2	<i>rpkA</i> ⁻
	<i>L. hackeliae</i>		<i>L. pneumophila</i> JR32 <i>dotA</i> ⁻	
24	98 %	65 %	93 %	53 %
34	100 %	87 %	99,9 %	80 %
48	100 %	99,6 %	100 %	94 %
72	100 %	100 %	100 %	100 %

5.2.2 Die Rolle von Atg9 in der *Legionella*-Infektion

In den letzten Jahren wird Autophagie zunehmend als Komponente des angeborenen Immunsystems diskutiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung und dem Abbau von intrazellulären Pathogenen. Von den bisher untersuchten Autophagieproteinen hatte das Membranprotein Atg9 als einziges einen deutlichen Einfluss auf den Infektionsverlauf von *Legionella* in *D. discoideum* (Tung *et al.*, 2010). Die Abwesenheit von Atg9 führte zu einer 85 % geringeren Aufnahme der Bakterien, einem verzögerten Abbau sowie schnelleren Replikationsanstieg. Diese Daten deuten auf einen protektiven Effekt der Autophagie zur Limitierung der *Legionella*-Infektion in *D. discoideum* hin. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt von zwei *atg9*-Komplementanten AAG1 und AGA5 in Bezug auf die Infektion mit *L. pneumophila* Corby untersucht. Atg9 liegt in diesen als GFP-Fusionsprotein vor und wird ca. 10-fach überexprimiert.

Zunächst erfolgte die phänotypische Charakterisierung verwendeter *D. discoideum*-Stämme in Bezug auf Sporenbildung und Wachstum in Flüssigkultur. Dies war nötig um auszuschließen, dass eine Kultivierung bei 25 °C an Stelle von 23 °C den beschriebenen Phänotyp (Tung *et al.*, 2010) beeinflusst. Dieser ist, wie in Abbildung 5.10 gezeigt, durch ein verlangsamtes Wachstum von *atg9*⁻ sowie durch eine Entwicklungsstörung der Fruchtkörperbildung (Abbildung nicht gezeigt) vom Wildtyp AX2 unterscheidbar. Nach 72 h erreichten die Komplementanten sowie der Wildtyp eine Zellzahl von ca. 7x10⁶/mL wohingegen *atg9*⁻ mit 4x10⁶/mL eine deutlich geringere Zellzahl aufwies.

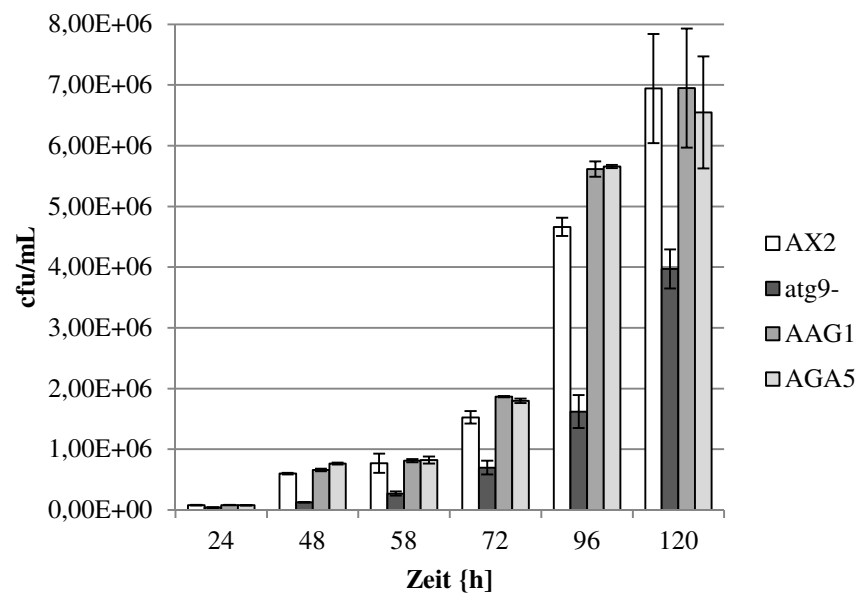


Abbildung 5.10: Vermehrung von *D. discoideum atg9* sowie den Komplementanten AAG1 und AGA5. *D. discoideum* AX2, die Deletionsmutante *atg9* sowie die *atg9*-Komplementanten AAG1 und AGA5 wurden in HL5-Medium bei 160 rpm und 25 °C im Dunkeln kultiviert. *Atg9* vermehrte sich im Verlauf von 120 h langsamer als der Wildtyp. Die Überexpression von *atg9* als GFP-Fusionsprotein führte zur vollständigen Reversion des Phänotyps der *atg9*-Deletion und wildtypischem Wachstum. Der Graph gibt Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten an.

Die Mutation von *atg9* äußert sich neben dem beschriebenen Phänotyp in einer reduzierten Aufnahmerate von *L. pneumophila* Corby nach 3-stündiger Infektion. Die Aufnahmerate fiel in *atg9* ca. 43 % geringer als im Wildtyp AX2 aus. Die 10-fache Überexpression von *atg9* als GFP-Fusionsprotein in AAG1 und AGA5 führte zu einer weiteren Reduktion der Aufnahme auf 19 % bzw. 23 % (Abbildung 5.11).

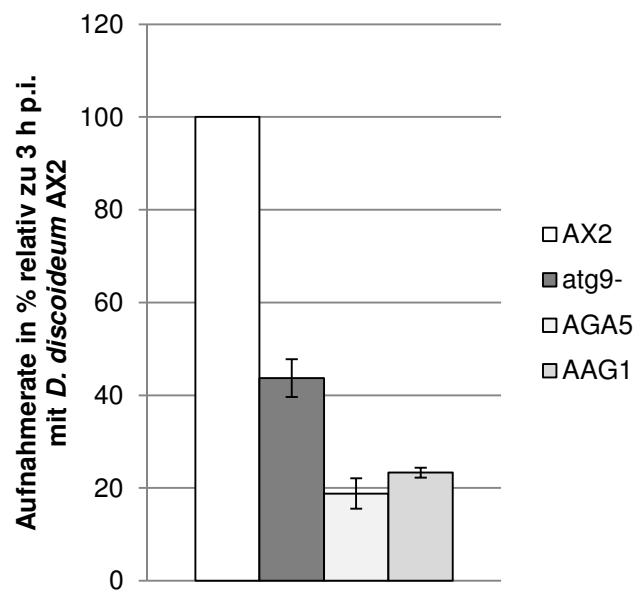


Abbildung 5.11: Invasion von *L. pneumophila* Corby in *D. discoideum* 3 h nach Infektion. *D. discoideum* AX2, die Deletionsmutante *atg9* sowie die *atg9*-Komplementanten AAG1 und AGA5 wurden für 3 h mit *L. pneumophila* Corby infiziert (MOI 2). *Atg9* zeigte eine um 43 % reduzierte Aufnahme im Vergleich zum Wildtyp. Die Überexpression von *atg9* als GFP-Fusionsprotein verringerte die Aufnahme auf 19 % für AGA5 bzw. 23 % für AAG1. Der Graph gibt Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten an.

Zusätzlich wurde die Expression von *atg9* als GFP-Fusionsprotein sowie die Infektion von AAG1 und AGA5 mit *Legionella* fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Beide *Atg9*-Komplementanten wurden mit rot fluoreszierenden *L. pneumophila* Corby mcherry (MOI 50) für 3 h infiziert. AAG1 sowie AGA5 phagozytierten *Legionella* und wiesen eine deutliche Expression von *Atg9*-GFP auf (Abbildung 5.12).

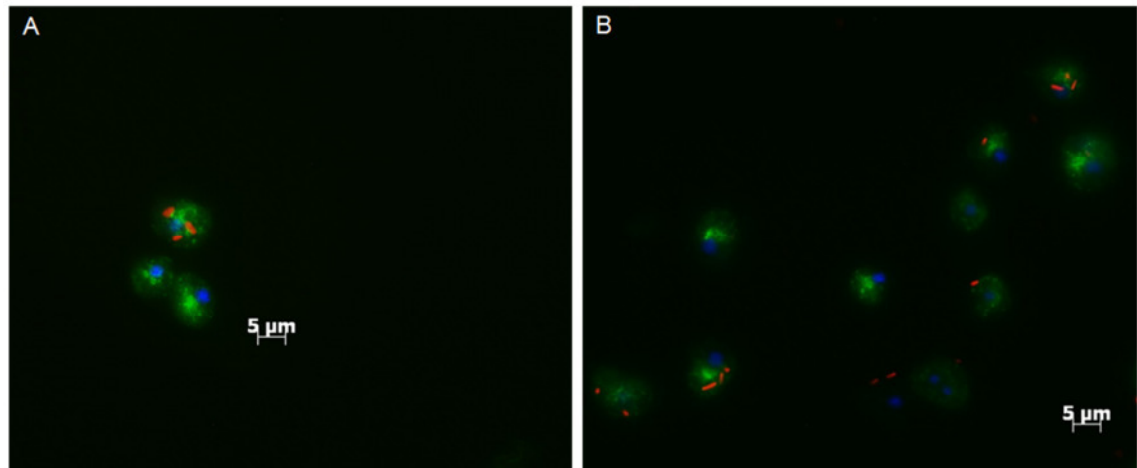


Abbildung 5.12: Fluoreszenzmikroskopie der Infektion von den *D. discoideum atg9*-Komplementanten AAG1 und AGA5 mit *L. pneumophila* Corby mcherry. Atg9 wird in den Komplementanten AAG1 (A) und AGA5 (B) als GFP-Fusionsprotein 10-fach überexprimiert (grün). AAG1 und AGA5 wurden für 3 h mit mcherry exprimierenden *L. pneumophila* Corby pXDC50 (rot) einer MOI 50 infiziert, mit 4 % PFA fixiert und der Zellkern mit DAPI gefärbt (blau).

Um sicherzustellen, dass der Phagozytosedefekt in *atg9* sowie den Komplementanten AAG1 und AGA5 ausgeglichen wird, wurde für die weiteren Infektionen eine MOI von 0,02 in 25 cm² Zellkulturflaschen ohne Gentamicin-Behandlung verwendet. Somit wurde die Aufnahme aller zur Verfügung stehenden Legionellen durch den jeweiligen *Dictyostelium*-Stamm gewährleistet.

In den ersten 24 h zeigten AX2, *atg9* sowie AAG1 und AGA5 einen ähnlichen Infektionsverlauf. Nach 48 h und 72 h führte die 10-fache Überexpression von *atg9* zu einer wesentlich schlechteren Vermehrung der Legionellen ($p \leq 0,001$). So wurde zum Zeitpunkt 72 h lediglich eine Verdopplung der Bakterienzahl erreicht, wohingegen die Replikation im Wildtyp sowie *atg9* einen 8- bis 12-fachen Anstieg relativ zum Wert bei 3 h aufwies (Abbildung 5.13).

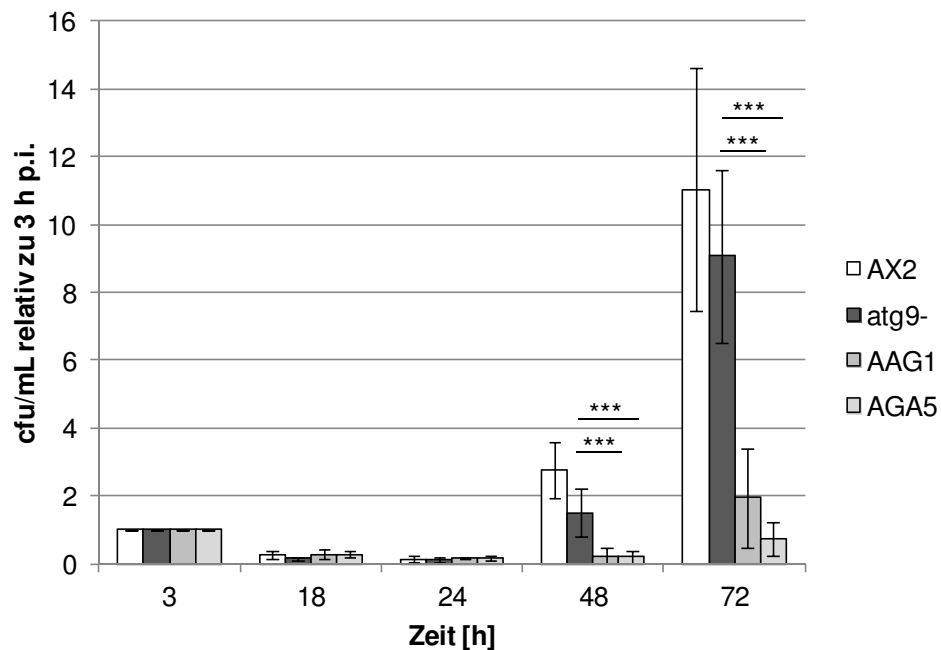


Abbildung 5.13: Infektionsstudien mit *L. pneumophila* Corby in verschiedenen *D. discoideum*-Stämmen. Die Deletionsmutante *atg9*, dessen Komplementanten AAG1 und AGA5 sowie der Wildtyp AX2 wurden für 3 h mit *L. pneumophila* Corby infiziert (MOI 0,02). Eine Überexpression von *atg9* als GFP-Fusionsprotein führte im Vergleich zum Wildtyp AX2 sowie *atg9* zu einer stark reduzierten Vermehrung von *Legionella* nach 48 h und 72 h ($p \leq 0,001$). Die Vermehrung von *Legionella* in der Mutante *atg9* und dem Wildtyp waren vergleichbar. Die cfu-Werte wurden auf den 3 h-Wert des jeweiligen Stammes relativiert. Der Graph gibt Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten an. * zeigen die p-Werte an. *** = $p \leq 0,001$ (t-Test).

5.2.3 Die Rolle der AAA-ATPase CdcD in der *Legionella*-Infektion

CdcD aus *D. discoideum* gehört zur Familie der Typ II AAA-ATPasen (ATPase associated with a variety of cellular activities) und ist unter Eukaryoten als p97 oder valosin containing protein (VCP) und Cdc48 in der Hefe *S. cerevisiae* hochkonserviert. Durch Bindung verschiedener Kofaktoren reguliert CdcD essentielle zelluläre Prozesse wie Zellteilung, Organellen-Biogenese, Bildung der Kernhülle und Protein-Degradation. Hierbei vermittelt es als Chaperon sowohl den Ubiquitin-vermittelten Abbau im Proteasom, die ER-assoziierte Degradation (ERAD) als auch die Degradation über Autophagie (Kondo *et al.*, 1997; Rabouille *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2000; Hetzer *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2001; Rabinovich *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2004; Lilley and Ploegh, 2005). Die Rolle von CdcD in Zusammenhang mit intrazellulären Erregern ist bisher wenig untersucht. Erste Studien mit humanen HEK293- sowie *Drosophila*-Zellen und *Legionella* zeigten jedoch eine *dot/icm*-abhängige Rekrutierung von CdcD an

die LCV sowie eine CdcD-abhängige Translokation der *Legionella*-Effektoren SidC und LidA von der LCV ins Zytosol. Die Inhibierung von p97 durch siRNA führte außerdem zu einer schlechteren Vermehrung von *Legionella* (Dorer *et al.*, 2006). Proteomstudien von *Legionella*-haltigen Phagosomen lieferten einen ersten Hinweis der Beteiligung von CdcD bei der Infektion mit *Legionella* in *D. discoideum* (Shevchuck *et al.* 2009). Aufgrund der scheinbar Spezies-übergreifenden Bedeutung für *Legionella*-Infektionen und der Rolle im Ubiquitin-vermittelten Abbau sowie autophagosomalen Prozessen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer zusätzlichen Punktmutation im Gen *cdcD* der Deletionsmutante *atg9* untersucht. Die Doppelmutante *atg9/cdcD_R155C-RFP* (im Folgenden als *atg9/cdcD⁻* bezeichnet) wurde freundlicherweise von L. Eichinger (Universität Köln) zur Verfügung gestellt.

Zunächst erfolgte die phänotypische Charakterisierung von *atg9/cdcD⁻* hinsichtlich des Vermehrungsverhaltens in Schüttelkultur bei 25 °C sowie die Fähigkeit Fruchtkörper auszubilden. Der Wildtyp AX2 vermehrte sich in Schüttelkultur bei 25 °C ca. dreifach schneller als *atg9/cdcD⁻* (Abbildung 5.14 A). Der Wildtyp AX2 bildete auch bei Zellzahlen von $\leq 1 \times 10^7$ /mL Fruchtkörper mit langen Stielen und gelblichen Köpfen aus, wohingegen die Mutante nicht dazu in der Lage war (Abbildung 5.14 B). Wurden höhere Zellzahlen ($>1 \times 10^7$ /mL) verwendet, so erfolgte bei *atg9/cdcD⁻* die Bildung verkümmelter Fruchtkörper mit kurzen Stielen und kleinen Sporenköpfen (Abbildung 5.14 C).

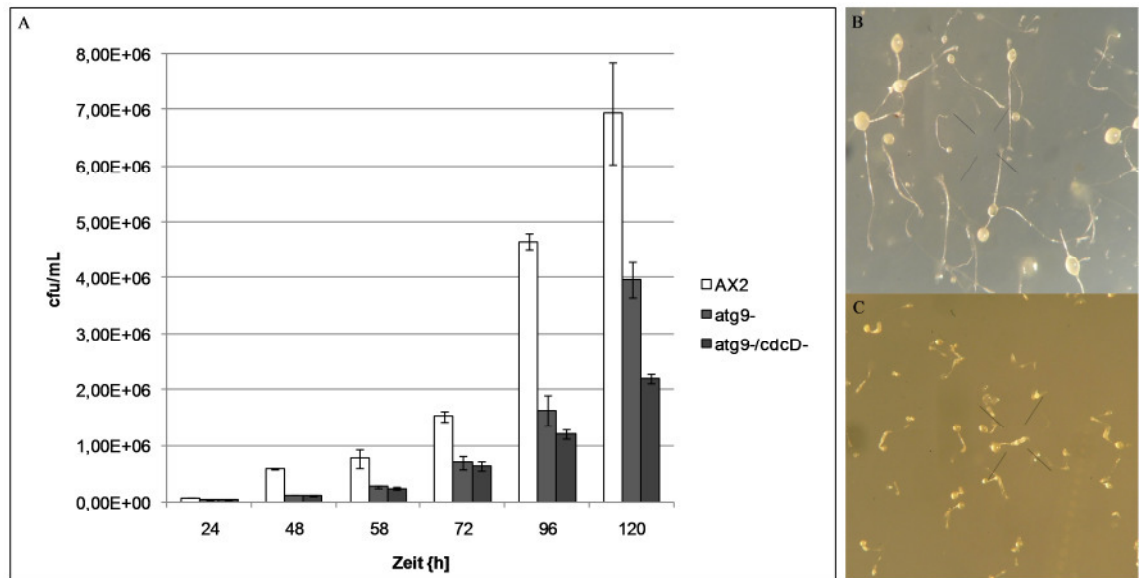


Abbildung 5.14: Vermehrung und Fruchtkörperbildung der *D. discoideum* Doppelmutante *atg9/cdcD*. *D. discoideum* AX2 und *atg9/cdcD* wurden in HL5-Medium bei 160 rpm und 25 °C im Dunkeln kultiviert. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte *atg9/cdcD* ein ca. 3-fach langsames Wachstum im Verlauf von 120 h. Der Graph gibt Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten an (**A**). Im Gegensatz zu AX2 (**B**) bildete die Doppelmutante unter Nährstoffmangel verkümmerte, kurze, dickstielige Fruchtkörper auf Soerensenagar aus (Zellzahl 1×10^7 /mL) (**C**).

Die Aufnahmerate von *L. pneumophila* Corby wurde durch Verwendung einer geringen MOI von 2 in 24 Well-Schalen bestimmt. Infektionsstudien wurden hingegen in kleinen Zellkulturflaschen mit (MOI 0,02) durchgeführt. Die *atg9/cdcD*-Doppelmutante wies eine 40-50 % geringere und somit der *atg9*-Einzelmutante entsprechende Aufnahmerate im Vergleich zum WT auf (Abbildung 5.15). Diese lag leicht über der Aufnahmerate in *atg9*-Zellen.

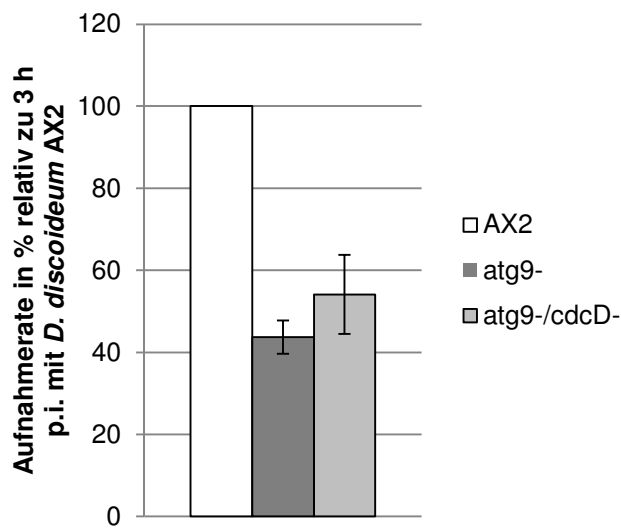


Abbildung 5.15: Invasionsstudien mit *L. pneumophila* Corby in der *D. discoideum* Mutante *atg9*/*cdcD*. Der Wildtyp AX2, die Deletionsmutante *atg9*⁻ sowie die Doppelmutante *atg9*/*cdcD*⁻ wurden für 3 h mit *L. pneumophila* Corby infiziert (MOI 2). Die Aufnahmerate von *atg9*/*cdcD*⁻ war um 40-50 % und bei *atg9*⁻ um ca. 43 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Der Graph gibt Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten an.

Infektionsstudien mit *Legionella* in *atg9*/*cdcD*⁻ sowie *atg9*⁻ zeigten im Infektionsverlauf über 72 h keinen Unterschied zum Wildtyp AX2. In allen drei Stämmen erfolgte zunächst ein Abbau der Bakterien bis 24 h nach Infektion. Anschließend führte die Vermehrung zu einem 8- bis 12-fachen Anstieg der Bakterienzahl (Abbildung 5.16).

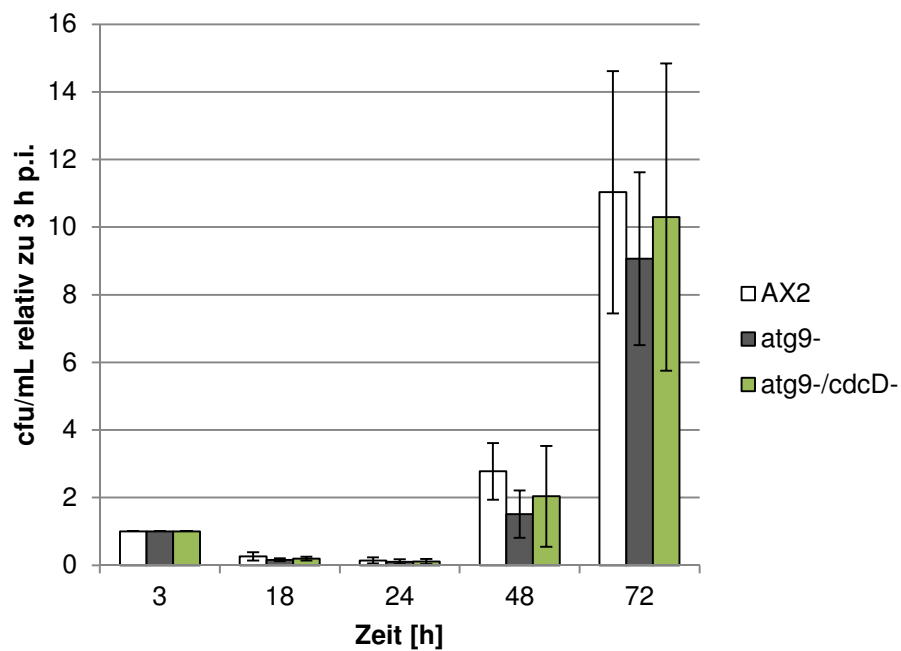


Abbildung 5.16: Infektionsstudien mit *L. pneumophila* Corby in der *D. discoideum* Mutante *atg9/cdcD*. Der Wildtyp AX2, die Deletionsmutante *atg9* sowie die Doppelmutante *atg9/cdcD* wurden für 3 h mit *L. pneumophila* Corby infiziert (MOI 0,02). Die Vermehrung von *Legionella* in den Mutanten *atg9* sowie *atg9/cdcD* ist vergleichbar zum Wildtyp AX2. Die cfu-Werte wurden auf den 3 h-Wert des jeweiligen Stammes relativiert. Der Graph gibt Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten an.

Atg9/cdcD-Zellen exprimieren das rot fluoreszierende Protein RFP. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Expression von RFP und die Lokalisation während einer Infektion mit *Legionella* überprüft. Auffällig war die ungleichmäßige Expression von RFP durch *atg9/cdcD* in infizierten sowie nicht infizierten Zellen (Abbildung 5.17 A und B). Wie in Abbildung 5.17 B gezeigt, konnte bereits nach 24-stündiger Infektion eine starke Vermehrung der Legionellen in *atg9/cdcD* beobachtet werden. Der weiße Pfeil markiert eine prallgefüllte LCV. Diese wird u.a. durch das Fehlen von RFP um die grünen Legionellen deutlich.

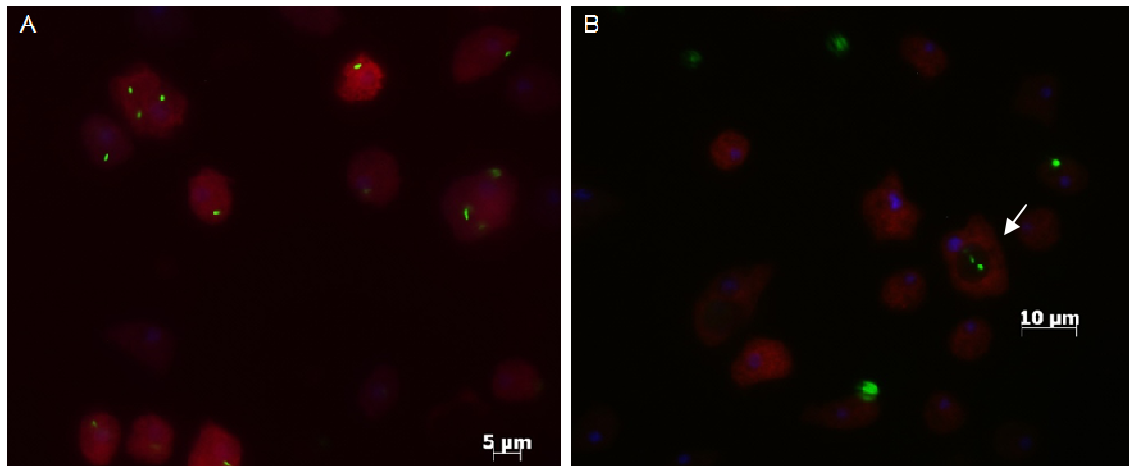


Abbildung 5.17: Fluoreszenzmikroskopie der Infektion von *D. discoideum atg9/cdcD* mit *L. pneumophila* Corby-GFP. *Atg9/cdcD*-Zellen exprimieren RFP (rot) und wurden für 3 h (A) bzw. 24 h (B) mit *L. pneumophila* Corby-GFP (MOI 50) infiziert (grün) und mit MeOH fixiert. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt (blau). Abb. 5.17 A zeigt die Aufnahme von *Legionella* durch die rot-fluoreszierenden *atg9/cdcD*-Zellen. Abb. 5.17 B zeigt die Vermehrung der Legionellen in der LCV nach 24 h (weißer Pfeil).

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene *D. discoideum*-Mutanten hinsichtlich ihres Verhaltens während der Infektion mit *L. pneumophila* untersucht. Bei *rpka*⁻ und *atg9*⁻ handelt es sich um Deletionsmutanten, bei denen das Gen durch homologe Rekombination entfernt wurde. Die Doppelmutante *atg9/cdcD*⁻ besitzt zusätzlich zur *atg9*-Deletion eine Punktmutation im Gen *cdcD* an Position R155C und exprimiert das rot-fluoreszierende Protein RFP. Die Stämme 1E7 und 1D9 stellen Komplementanten von *rpka*⁻, AAG1 und AGA5 von *atg9*⁻ dar. In letzteren wurde Atg9 als GFP-Fusionsprotein 10-fach überexprimiert.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte eine Kolokalisation von RpkA mit hitzeinaktivierten sowie lebenden *L. pneumophila* JR32 und die Anlagerung der H⁺-ATPase an die LCV gezeigt werden. Die Mutation von *rpka* führte zu einer 12-fach erhöhten Vermehrung nach 48 h sowie 72 h. Weiterhin fand ein verzögerter Abbau avirulenter *L. pneumophila* JR32 *dotA*⁻ und *L. hackeliae* in *rpka*⁻-Zellen statt. Nach 24 h waren bereits über 90 % der Legionellen in AX2 gegenüber 60 % in *rpka*⁻ abgebaut. Im Wildtyp sowie in der Mutante erfolgte letztendlich ein vollständiger Abbau der avirulenten Legionellen über 72 h.

Bei Verwendung einer geringen MOI von 2 führte das Fehlen von ATG9 zu einer verringerten Aufnahme von *L. pneumophila* Corby. Im Vergleich zum Wildtyp AX2 war diese in *atg9*⁻ um 43% verringert. Die 10-fache Überexpression von *atg9* in AAG1 und AGA5 als GFP-Fusionsprotein führte zur vollständigen Reversion des Phänotyps der *atg9*-Deletion in Bezug auf Wachstum und Sporenbildung. Im Vergleich mit AX2 wurden nach 3-stündiger Infektion 18-23 % weniger Legionellen phagozytiert. Außerdem wiesen die Komplementanten eine signifikant verringerte Vermehrung von *Legionella* zu späten Infektionszeitpunkten (48 h und 72 h) auf.

Im Vergleich mit *atg9* zeigte die Doppelmutante *atg9/cdcD*⁻ eine langsamere Vermehrung in Schüttelkultur bei 25 °C. Wie für *atg9* beschrieben, war die Aufnahme von *L. pneumophila* Corby in *atg9/cdcD*⁻ um 43-50 % im Vergleich zu AX2 reduziert. Weder die Deletion von *atg9* noch die zusätzliche Punktmutation im Gen *cdcD* der Doppelmutante *atg9/cdcD*⁻ hatten einen Einfluss auf den Infektionsverlauf von *L. pneumophila*.

5.3 Isolation und Charakterisierung von *Legionella*-Inhibitoren aus *B. pumilus*

Gram-positive Bakterien der Gattung *Bacillus* produzieren eine Vielfalt biologisch aktiver Metabolite, wobei das Spektrum sehr spezifisch für den jeweiligen Stamm ist. In dieser Arbeit konnte *Bacillus pumilus* DKS1 von einer mit *L. pneumophila* Corby bewachsenen BCYE-Agarplatte isoliert und mittels 16 S rRNA Sequenzierung identifiziert werden. *B. pumilus* kommt ubiquitär vor und produziert eine Reihe unterschiedlicher Verbindungen mit fungizider, antiviraler, antibakterieller sowie antitumor-Aktivität (Munimbazi & Bullerman, 1998, Naruse *et al.*, 1989, Pereira de Melo *et al.* 2009). Aufgrund der starken Hemmung von *Legionella* spp. (Abbildung 5.18) war die Isolation und Strukturaufklärung der aktiven Substanz von großem Interesse.



Abbildung 5.18: Hemmung von *L. pneumophila* Corby durch *B. pumilus*.

Charakterisierung von *B. pumilus* Rohextrakt

Um die biologische Aktivität von *B. pumilus* DKS1 näher zu bestimmen wurden zunächst Rohextrakte in kleinem Maßstab über Agarextraktion sowie Flüssigextraktion in LB bzw. YEB-Medium (s. Abschnitt 4.3) hergestellt. Diese Vorarbeiten dienten der Optimierung der Kulturbedingungen für *B. pumilus*. Die stärkste Produktion des Hemmstoffes fand auf LB bzw. BCYE-Agar im Verlauf von 48 h statt. Rohextrakte aus Agarextraktionen wiesen minimale Hemmkonzentrationen (MHK) von 12,5 µg/mL bis 25 µg/mL für *L. pneumophila* auf, Rohextrakte aus Kulturüberständen der Flüssigextraktionen (24 h) besaßen eine MHK zwischen 50 µg/mL und 100 µg/mL. Die Verwendung von

Schikanekolben steigerte hierbei die Ausbeute. Eine längere Kultivierung von *B. pumilus* in Flüssigkultur über 48 h konnte die Produktion des Hemmstoffes nicht weiter erhöhen. Im Gegensatz zu den Kulturüberständen waren Rohextrakte aus dem Zellsediment in einer Konzentration von $\leq 800 \mu\text{g/mL}$ inaktiv.

Um das inhibitorische Spektrum von *B. pumilus* DKS1 sowie der hergestellten Rohextrakte zu analysieren wurden weitere Gram-negative und Gram-positive Bakterien, Pilze, die Grünalge *Chlorella fusca* sowie das Gras *Agrostis stolonifera* in Kokulturen sowie im Plättchentest mit den Rohextrakten ($400 \mu\text{g/Plättchen}$) aus Agar- und Flüssigkulturen untersucht (s. Abschnitt 4.4.3). Der isolierte *Bacillus*-Stamm wies ein sehr spezifisches inhibitorisches Spektrum auf, in dem zusätzlich zu *Legionella* spp. nur *Streptococcus pneumoniae* und der phytopathogene Pilz *Microbotryum violaceum* gehemmt wurden (Tabelle 5.4). Eine Sonderstellung nimmt der phytopathogene Pilz *Rhizoctonia solani* ein. Dieser wurde in Kokulturen zunächst von *B. pumilus* gehemmt. Nach drei Wochen zeigten sich jedoch kleine Lysehöfe im Bakterienrasen und ein langsames Hyphenwachstum. Im Gegensatz dazu zeigte der Rohextrakt keine fungizide Wirkung auf *Rhizoctonia solani*. *Chlorella fusca* wurde leicht durch Rohextrakte aus Agar- sowie Flüssigextraktion gehemmt, wobei das Zellsediment ebenfalls aktiv war. Nach einer Woche war ein deutlicher Hemmhof von ca. 1,1 cm für beide Extrakte zu erkennen. Dieser verschwand jedoch nach weiterer 4- bis 5-tägiger Inkubation. Die Keimung und das Wachstum von *Agrostis stolonifera* wurden nicht durch *B. pumilus*-Extrakt beeinflusst.

Tabelle 5.4: Biologisches Screening von *B. pumilus*. Durchgeführt wurden Kokulturen sowie Plättchentests mit Rohextrakten auf entsprechenden Nährmedien.

Stamm	Hemmung	
Gram- negative Bakterien		
Acinetobacter spec. ADP1	- ^a	γ- Proteobakterien
Erwinia carotovora subsp. Atroseptica SCRI1043	- ^a	
Escherichia coli HB101	- ^a	
Klebsiella aerogenes	- ^a	
Legionella pneumophila Corby	+ ^{a, b}	
Legionella pneumophila Phil.I JR32	+ ^{a, b}	
Legionella hackeliae SG1	+ ^{a, b}	
Legionella anisa	+ ^{a, b}	
Legionella bozemanii	+ ^{a, b}	
Legionella dumoffii	+ ^{a, b}	
Legionella feelei	+ ^{a, b}	
Legionella gormanii	+ ^{a, b}	
Legionella israelensis	+ ^{a, b}	
Legionella jordanis	+ ^{a, b}	
Legionella longbeachae SG1	+ ^{a, b}	
Legionella lytica	+ ^{a, b}	
Legionella micdadei	+ ^{a, b}	
Pseudomonas aeruginosa PAO1	- ^a	
Salmonella enterocolitica	- ^a	
Xanthomonas campestris vesicatoria strain 85-10	- ^a	
Yersinia pseudotuberculosis YPIII	- ^a	
Agrobacterium tumefaciens str. C58	- ^a	α- Proteobacteria
Burkholderia cepacia LC 21-3b	- ^a	β- Proteobacteria
Ralstonia eutropha JMP 134	- ^a	
Gram-positive Bakterien		
Bacillus megaterium	- ^{a, b}	
Listeria monocytogenes	- ^a	
Mycobacterium avium	- ^a	
Streptococcus pneumoniae Serotyp 2 (D39)	+ ^b	
Streptococcus pneumoniae Serotyp 35A (D37)	+ ^b	
Staphylococcus aureus	- ^a	
Pilze / Gräser / Algen		
Botrytis cinerea	- ^{a, b}	
Cryptococcus neoformans	- ^{a, b}	
Microbotryum violaceum	+ ^{a, b}	
Pythium debaryanum	- ^{a, b}	
Saccharomyces cerevisiae	- ^b	
Thanatephorus cucumeris (teleomorph) / Rhizoctonia solani (anamorph)	+/- ^a - ^b	
Chlorella fusca	+ ^b	
Agrostis stolonifera	- ^c	

+ (Hemmung); - (keine Hemmung); +/- (beidseitige Hemmung); ^a (Kokultur); ^b (Plättchentest, 400 µg/Plättchen); ^c (Flüssigkultur, 400 µg/mL)

Neben dem Einfluss auf Prokaryoten, Pilzen, Grünalgen und Gräsern wurde die Zytotoxizität der Rohextrakte auf die humane Makrophagen Zell-Linie U937 untersucht. Zytotoxizitätstests mit Alamar blue zeigten, dass Konzentrationen unter 200 µg/mL Rohextrakt über einen Zeitraum von 24 h die Zellviabilität nicht

beeinflussten. Nach 48 h waren bereits 100 µg/mL zytotoxisch und führten zur Lyse der Zellen. Erst Konzentrationen unter 100 µg/mL überlebten die Zellen unbeschadet. Auf Schafsblutagar sowie humanem Blutagar wies *B. pumilus* eine starke β -Hämolyse bzw. α -Hämolyse auf.

Dünnschichtchromatographie

Um abschätzen zu können, wie viele Substanzen in den jeweiligen Extrakten (Agarextraktion bzw. Flüssigextraktion) vorkommen und ob diese unterschiedlich stark vertreten sind, wurden Dünnschichtchromatogramme mit 10 % MeOH in DCM durchgeführt. Die anschließende Betrachtung bei 366 nm und 254 nm sowie Färbungen mit Anisaldehyd, Chlorine / *o*-Dianisidin-Reagenz sowie Ninhydrin zeigten ein ähnliches Bandenspektrum von Agar- und Flüssigextrakten in Bezug auf die R_f -Werte. Im Zellsediment waren hingegen wesentlich weniger Substanzen enthalten (Abbildung 5.19). Da *Legionella* durch das verwendete Kieselgel inhibiert wurde, war eine Eingrenzung der aktiven Substanz über Bioautogramme nicht möglich.

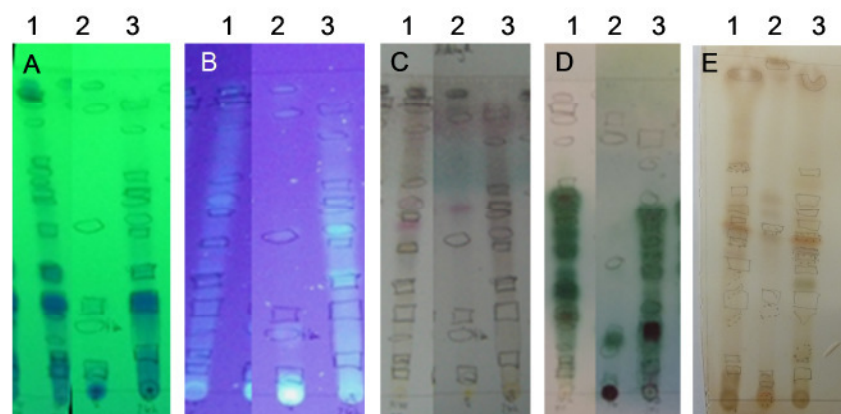


Abbildung 5.19: Dünnschichtchromatogramme der Agar- und Flüssigextraktion von *B. pumilus*. In den Spuren 1-3 wurden jeweils 10 µL (20 mg/mL) der Proben BCYE-Agar-Extrakt (24 h), Zellsediment sowie Überstand der YEB-Extraktion (24 h) aufgetragen. Dünnschichtchromatogramme wurden in 10 % MeOH/DCM durchgeführt und anschließend bei 254 nm (A) und 366 nm (B) betrachtet. Zusätzlich wurden eine Anisaldehydfärbung (C) sowie Peptidfärbungen mit Chlorine / *o*-Dianisidin-Reagenz (D) und Ninhydrin (E) durchgeführt. Die Agar- und Flüssigextraktionen besitzen ein sehr ähnliches Bandenmuster im Fluoreszenzspektrum sowie bei den durchgeführten Färbungen. Es sind viele fluoreszierende Stoffe und viele Peptidverbindungen enthalten. Das Zellsediment enthält hingegen deutlich weniger Verbindungen.

Temperatur- und pH-Stabilität

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Temperatur- und pH-Stabilität der aktiven Substanz ermittelt. Hierfür wurde Rohextrakt zum einen ü.N. bei pH 1 und pH 14 inkubiert bzw. bei 120 °C für 15 min autoklaviert. Die behandelten Rohextrakte wiesen keinen Aktivitätsverlust gegenüber unbehandelten Proben in Bezug auf die Inhibition von *Legionella* auf.

Strukturaufklärung

Bacilli produzieren eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen. Aus diesem Grund erfolgte zunächst ein chemisches Screening des Agar-Rohextraktes von *B. pumilus* DKS1 mittels HPLC-MS. Das erhaltene Spektrum zeigte auffällige Massen von 1035-1079 (Abbildung 5.20). Moleküle mit solch großem Molekulargewicht können oft Peptiden zugeordnet werden. Da die Substanz mit 100 % MeOH eluiert wurde, handelt es sich um eine unpolare Verbindung. Ein Abgleich mit der Naturstoffdatenbank Antibase (Prof. H. Laatsch, Universität Göttingen) führte zu einer Auflistung von zyklischen Peptiden wie z.B. Surfactin, Pumilacidin und Bacillomycin. Weiterhin zeigte die dünnschicht-chromatographische Analyse der Extrakte viele fluoreszierende Substanzen bei 366 nm sowie 354 nm. Durch die Peptidfärbungen mit Chlorine / o-Dianisidin-Reagenz wurden auffällig viele grüne Banden sichtbar, wohingegen die Reaktion mit Ninhydrin nahezu keine Färbung der DC zeigte. Dies deutete auf das Vorhandensein von zyklischen Peptiden hin, da diese keine freien Aminogruppen besitzen und nicht mit Ninhydrin reagieren.

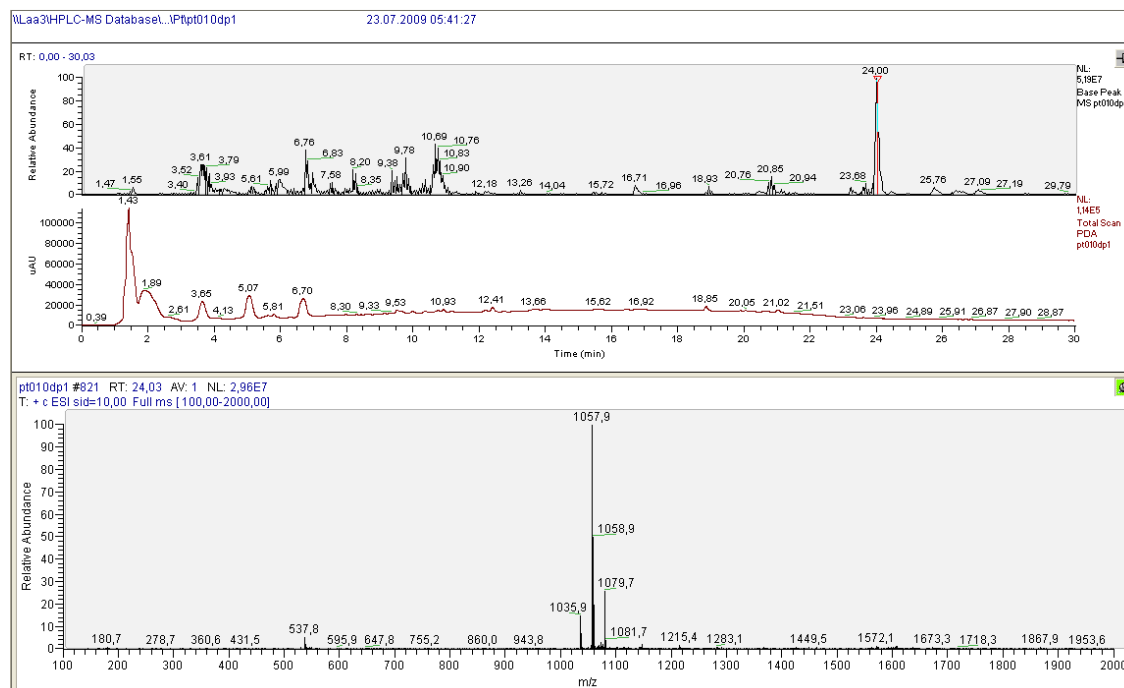


Abbildung 5.20. Chemisches Screening von *B. pumilus* Rohextrakt (Agarextraktion) durch HPLC-MS. Das erhaltene Spektrum von *B. pumilus* DKS1-Rohextrakt wurde mit der Naturstoffdatenbank Antibase (Prof. H. Laatsch, Naturstoffdatenbank Universität Göttingen) abgeglichen. Auffällig waren die Massen 1035-1079, bei denen es sich um homologe Peptide mit Ähnlichkeiten zur Gruppe der Acylpeptide handeln könnte. (Säule: Synergi Max-RP 150 x 2.00 mm, Lösungsmittel A: MeOH / 0,05 % HCOOH, Lösungsmittel B: H₂O / 0,05 % HCOOH, Flussrate 300 µL/min, Gradient. Start 10 % oder 20 % von A, 0-20 min von 10 % oder 20 % A bis 100 % A, 20-30 min 100 % A.

Basierend auf den Ergebnissen der Agar- und Flüssigextraktionen wurden für die Bereitstellung großer Extraktmengen Kulturen in einem 50 L Fermenter (LB-Medium, 35 °C, 24 h) sowie 30 L Schüttelkultur (LB-Medium, 28 °C, 24 h) angesetzt und aufgearbeitet. Obwohl mittels Agarextraktion geringere MHKs der Rohextrakte (MHK = 12,5 µg/mL) für *Legionella* erzielt werden konnten, wurde die Flüssigkultur (MHK = 50 µg/mL) als Großansatz bevorzugt. Hierdurch konnte mehr Extrakt mit geringerem Zeitaufwand hergestellt werden.

Aufarbeitung des Kulturüberstandes

Die Aufarbeitung des Kulturüberstandes sowie die Isolation von vier Reinsubstanzen (Peptiden) ist in Abbildung 5.21 dargestellt. Die Isolation sowie Strukturaufklärung erfolgten in Kooperation mit Herrn Hongpeng Wang (Institut für organische und biomolekulare Chemie, Universität Göttingen). Zur Reinigung der antimikrobiellen Substanzen wurde zunächst die *B. pumilus*-Kultur durch eine Filterpresse gegeben und flüssige Bestandteile vom

Zellsediment getrennt. Das Filtrat wurde auf eine XAD 16-Säule gegeben, mit MeOH eluiert und in einem Rotationsverdampfer eingengt. Alle anschließenden Aufarbeitungsschritte zur Isolation und Identifikation der Hemmstoffe wurden von Herrn Hongpeng Wang (Institut für organische und biomolekulare Chemie, Universität Göttingen) durchgeführt und sind in Abbildung 5.21 schematisch dargestellt.

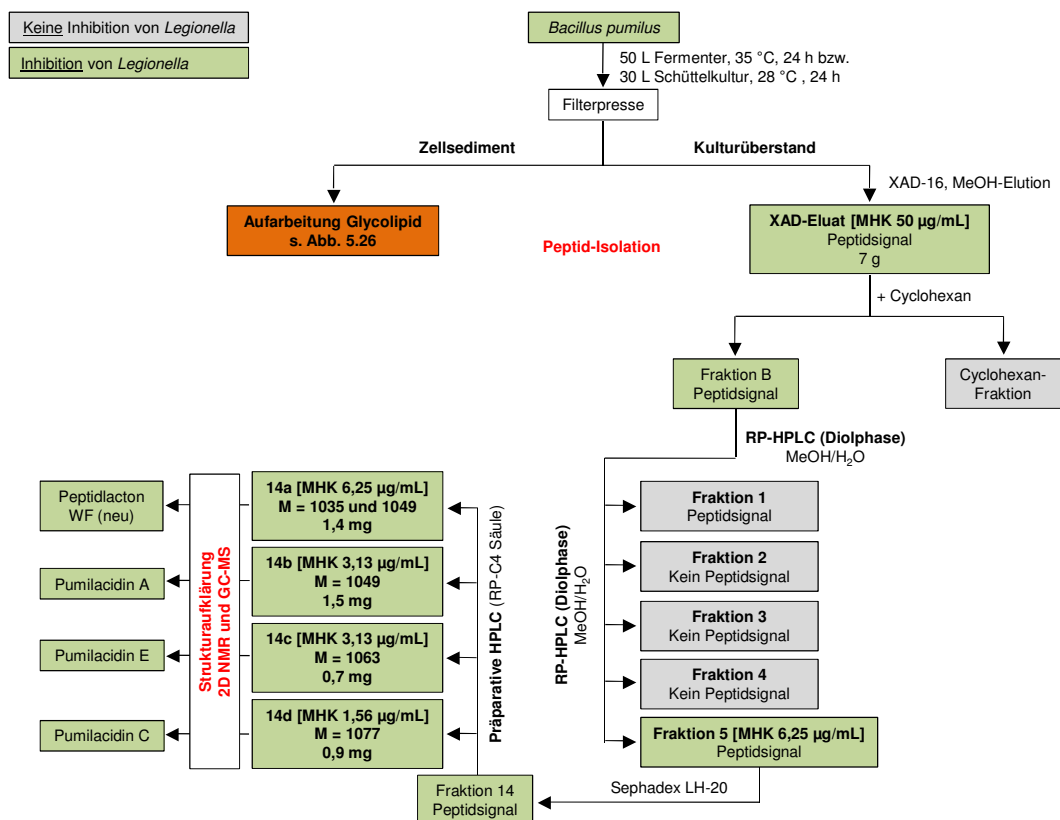


Abbildung 5.21: Isolation von Peptiden aus *B. pumilus*-Kulturüberstand mit bakterizider Wirkung auf *Legionella*. Mit Hilfe einer Filterpresse wurden Zellsediment und Kulturüberstand der *B. pumilus*-Flüssigkultur voneinander getrennt. Das Filtrat wurde auf eine XAD-16-Säule gegeben, mit MeOH eluiert und im Rotationsverdampfer eingengt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Chlorine / *o*-Dianisidin-Test auf Vorhandensein von Peptiden untersucht und auf Aktivität gegen *L. pneumophila* Corby getestet. Grün hinterlegte Fraktionen enthalten Peptide und inhibierten *L. pneumophila*. Grau hinterlegte Felder zeigen Fraktionen ohne Peptidanteil und besaßen keine antibakterielle Wirkung. Durch Zugabe von Cyclohexan wurden Fette abgetrennt und verworfen. Die erhaltene Fraktion B wurde mittels RP-HPLC (Diolphase) über einen MeOH/H₂O-Gradienten in die Fraktion 1-4 aufgetrennt. Die Peptidfraktion 5 wurde über eine Sephadex LH-20 Säule mit MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) in mehr als 14 Einzelfractionen getrennt. Die Peptidfraktion 14 inhibierte *L. pneumophila* mit 6,25 µg/mL. Aus dieser Fraktion wurden über präparative HPLC unter Verwendung einer analytischen RP-C4 Säule vier aktive Fraktionen mit den Reinsubstanzen 14a-d und den Massen 1035, 1049, 1063 bzw. 1077 isoliert. Die MHK der Fraktionen 14a-d für *L. pneumophila* Corby betrug 6,25 µg/mL, 3,125 µg/mL, 3,125 µg/mL sowie 1,56 µg/mL. Die Strukturaufklärung erfolgte über 2D NMR und GC-MS. Bei den Fraktionen 14a-d wurden als neues Peptidolacton WF, A, E und C identifiziert.

Durch Zugabe von Cyclohexan erfolgte die Entfettung des gewonnenen Rohextrakts. Dieser wurde mittels RP-HPLC über einen MeOH/H₂O-Gradienten in 5 Fraktionen getrennt. Fraktionen 1-4 inhibierten *Legionella* schwach. Fraktion 5 besaß hingegen eine MHK von 6,25 µg/mL für *L. pneumophila* Corby und zeigte ein deutliches Peptidsignal im Chlorine / *o*-Dianisidin-Test. Das LC-MS Spektrum wies ebenfalls Peptidsignale auf. Diese aktive Peptidfraktion wurde durch Größenausschlusschromatographie über eine LH-20-Säule mit MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) weiter aufgereinigt. Aus Fraktion 14 konnten mittels semi-präparativer HPLC (RP-C4 Säule) 4 Peptidfraktionen mit den Retentionszeiten 9.7, 11.9, 13.7 und 16.1 isoliert werden (Abbildung 5.22).

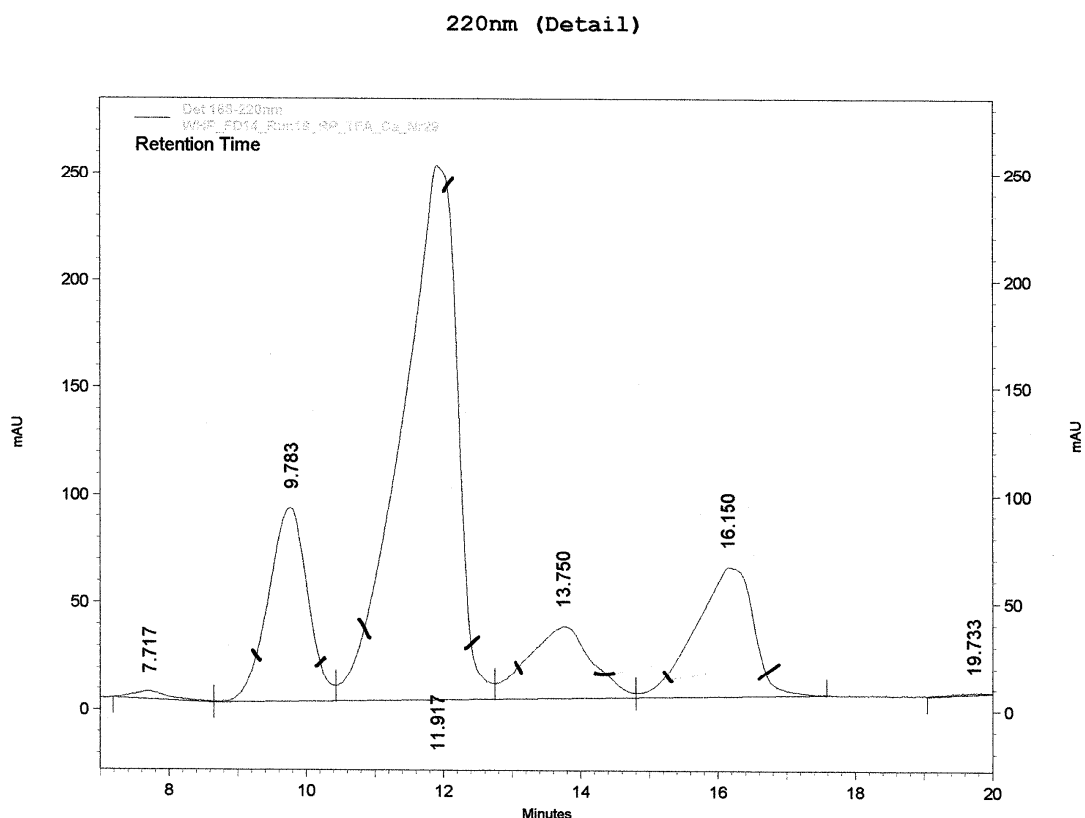


Abbildung 5.22: Chromatogramm der semi-präparativen HPLC von Peptidfraktion 14 aus *B. pumilus*-Kulturüberstand. Durch Verwendung einer semi-präparativen HPLC konnten 4 Peptidfraktionen mit den Retentionszeiten 9.7, 11.9, 13.7 und 16.1 aus Peptidfraktion 14 isoliert werden. (Säule: Vydac 214TP510 C4 250 mm x 10 mm, mobile Phase: A = 100 % H₂O / 0,1 % TFA, B = 80 % Acetonitril / 0,1 % TFA, Flussrate 4 mL/min, Gradient: Start mit 70 % B, 5 min bei 70 %, 5-40 min 70-78 %, Detektion bei 220 nm).

Diese Fraktionen waren nicht UV-aktiv. Sie besaßen jedoch eine hohe Aktivität gegenüber *Legionella* und wurden mittels 2D NMR und GC-MS als Pumilacidin A (RT: 11.92; M = 1049), neues Peptidlacton WF (RT: 9.78; M = 1035),

Pumilacidin C (RT: 16.16; M = 1077) und Pumilacidin E (RT: 13.75; M = 1063) identifiziert (Abbildung 5.23) (Wang, 2012). Das neu isolierte Peptidlacton WF besitzt große Ähnlichkeit zu Pumilacidin B und unterscheidet sich lediglich in der Aminosäurenreihenfolge. Pumilacidin B besteht aus den Aminosäuren Glu-Leu-Leu-**Leu-Asp**-Leu-Val. Die Analyse des neuen Peptidlactons WF ergab die Reihenfolge Glu-Leu-Leu-**Asp-Leu**-Leu-Val. Die Peptidsequenz des neuen Peptidlactons kann entweder über eine Amidbindung von Val mit Glu (Abb. 5.23 A) oder über eine Esterbindung von Val mit der Hydroxygruppe des Fettsäurerests (Abb. 5.23 B) erfolgen. Hier konnte nicht abschließend geklärt werden, welche Konformation vorliegt. Wahrscheinlicher ist die Konformation A, da diese größere Ähnlichkeit zu Pumilacidinen aufweist (Wang, 2012).

Im Allgemeinen gehören Pumilacidine zu den zyklischen Acylheptapeptiden. Ihre Peptidsequenz besteht aus zwei Leucin, zwei D-Leucin, L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure und L-Isoleucin (oder Valin) und einer unterschiedlich langen β -Hydroxyfettsäure.

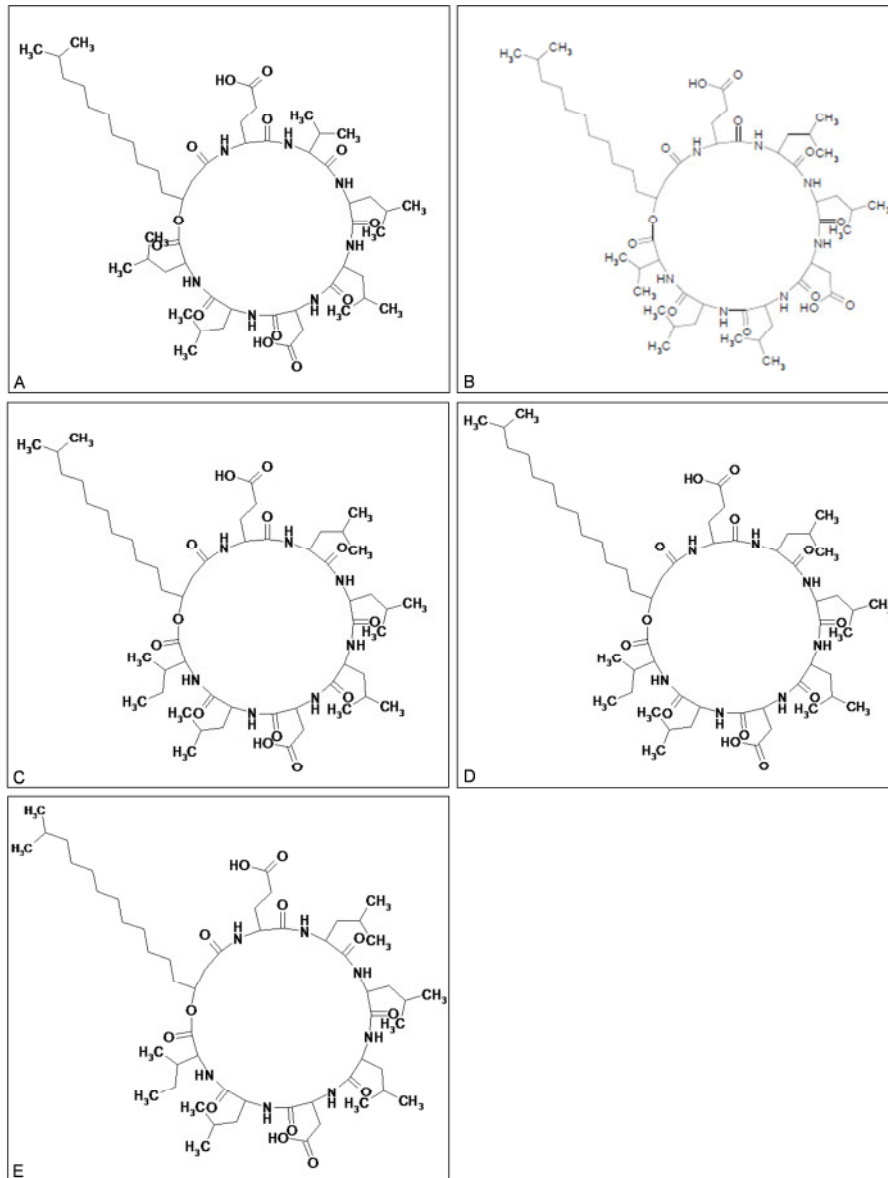


Abbildung 5.23: Struktur von Pumilacidin A, C, E sowie dem neuen Peptidlacton aus *B. pumilus* DKS1-Kulturüberstand. Dargestellt sind die Strukturen des neuen Peptidlactons (A und B), Pumilacidin A (C), Pumilacidin C (D) und Pumilacidin E (E). Das Peptidlacton WF besitzt die AS-Reihenfolge Glu-Leu-Leu-**Asp**-Leu-Leu-Val und unterscheidet sich damit von Pumilacidin B mit der AS-Reihenfolge Glu-Leu-Leu-**Leu**-**Asp**-Leu-Val. Für das neue Peptidlacton konnte die endgültige Struktur nicht eindeutig bestimmt werden. Sowohl Struktur A als B sind möglich.

Aufgrund der geringen Ausbeuten (1,5 mg Pumilacidin A; 1,4 mg neues Peptidlacton WF; 0,9 mg Pumilacidin C und 0,7 mg Pumilacidin E) konnte das inhibitorische Spektrum der Reinsubstanzen nur für eine kleine Auswahl an Bakterien bestimmt werden. Die isolierten Peptidlactone inhibierten mit hoher Spezifität *L. pneumophila* Corby, *L. hackeliae* sowie *S. pneumoniae* D39.

E. coli, *K. aerogenes* sowie *B. megaterium* wurden nicht im Wachstum gehemmt. Den stärksten inhibitorischen Effekt auf *Legionella* ($1 \times 10^7/\text{mL}$) hatte Pumilacidin C. Eine Konzentration von 2 μM wirkte nach 48-stündiger Inkubation bereits bakterizid, wohingegen 3 μM von Pumilacidin A und E sowie 6 μM des Peptidlactons WF nötig waren um denselben Effekt zu erzielen. Mit zunehmender Länge des Fettsäurerestes nahm die inhibitorische Wirkung auf *Legionella* zu. Die MHK für *S. pneumoniae* betrug 3 μM für die eingesetzten Peptidlactone. Die Hemmung von Streptokokken setzte bereits nach 30-minütiger Co-Inkubation mit den jeweiligen Peptidlactonen ein und verlief damit wesentlich schneller als für *Legionella*. Nach 24-stündiger Co-Inkubation konnten keine Bakterien mehr nachgewiesen werden.

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde in diesem Zusammenhang eine weitere Substanz, „Patnam“ getestet. Diese wurde freundlicherweise von Prof. Laatsch (Institut für organische und biomolekulare Chemie, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine Pumilacidin B-ähnliche Verbindung, welche aus dem indischen, marinen Streptomyceten Bs-X/1534 isoliert wurde (persönliche Mitteilung, Prof. H. Laatsch, Universität Göttingen, 2012). Da „Patnam“ in größeren Mengen zur Verfügung stand, konnten weitere Bakterienstämme getestet werden. Patnam besaß wie Pumilacidin A, C, E und das neue Peptidlacton WF ein sehr spezifisches inhibitorisches Spektrum. Die MHK für *L. pneumophila* Corby betrug 6 μM sowie 3 μM für *S. pneumoniae*. *E. coli*, *K. aerogenes*, *Ps. aerogenes* PAO1, *B. megaterium*, *L. monocytogenes*, *Staph. aureus* sowie *S. cerevisiae* wurden durch eine maximal eingesetzte Konzentration von 386 μM nicht gehemmt (s. Tabelle 5.5).

Um die Wirksamkeit der Peptidlactone besser einordnen zu können, wurden diese mit dem Antibiotikum Erythromycin verglichen. Erythromycin gehört zu den zyklischen Makrolidantibiotika und wird aktiv in der Therapie gegen Legionellose eingesetzt. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Inhibition der Proteinbiosynthese. Für Erythromycin betrug die MHK 4-9 μM und lag damit im selben Bereich wie für Pumilacidin A, C, E, dem Peptidlacton WF sowie für „Patnam“. Die Wirkung setzte ebenfalls über einen Zeitraum von 48 h ein.

Erythromycin wirkte außerdem inhibierend auf *B. megaterium* und ab 546 μM auf *E. coli* und *K. aerogenes*. *Ps. aeruginosa* wurde nicht inhibiert (s. Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5: Antibakterielles Spektrum von Pumilacidin A, C, E, dem neuen Peptidlacton WF, „Patnam“ (Pumilacidin B-ähnliche Substanz) sowie Erythromycin. Die Bestimmung der MHK erfolgte in Flüssigkulturen durch Co-Inkubation der Bakterien mit der Wirksubstanz.

	<i>L. pneumophila</i> Corby	<i>L. hackelliae</i>	<i>S. pneumoniae</i> SpnD39	<i>E. coli</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Ps. aerogenes</i> PAO1
Peptidlacton WF $\text{C}_{53}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{13}$	6 μM	6 μM	3 μM	-	-	-	nt	nt	nt
Pumilacidin B-ähnlich/ „Patnam“	6 μM	6 μM	3 μM	-	-	-	-	-	-
Pumilacidin A $\text{C}_{54}\text{H}_{95}\text{N}_7\text{O}_{13}$	3 μM	3 μM	3 μM	-	-	-	nt	nt	nt
Pumilacidin E $\text{C}_{55}\text{H}_{97}\text{N}_7\text{O}_{13}$	3 μM	3 μM	3 μM	-	-	-	nt	nt	nt
Pumilacidin C $\text{C}_{56}\text{H}_{99}\text{N}_7\text{O}_{13}$	2 μM	2 μM	3 μM	-	-	-	nt	nt	nt
Erythromycin $\text{C}_{37}\text{H}_{67}\text{NO}_{13}$	4-9 μM	nt	nt	546 μM	546 μM	≤ 4 μM	nt	nt	-

Keine Hemmung (-); nicht getestet (nt)

Zusätzlich zum bakteriellen Wirkungsspektrum wurde die Zytotoxizität des Rohextraktes aus *B. pumilus* und „Patnam“ auf U937-Makrophagen mittels Alamar blue Assay untersucht (s. Abschnitt 4.4.3). „Patnam“ bzw. *B. pumilus* Rohextrakt wurden für 24 h und 48 h mit den Zellen inkubiert. Nach 24 h wirkten 200 $\mu\text{g/mL}$ Rohextrakt sowie 100 $\mu\text{g/mL}$ (97 μM) „Patnam“ zytotoxisch. Nach 48 h reduzierten 100 $\mu\text{g/mL}$ Rohextrakt die Viabilität der Makrophagen um 30 % und 50 $\mu\text{g/mL}$ (48 μM) „Patnam“ um 10 %. Damit liegt die zytotoxische Wirkung von Pumilacidin B/„Patnam“ und vom Rohextrakt um Faktor 16 bzw. 32 niedriger als der bakterizide Effekt auf Legionellen und Streptokokken.

Pumilacidin wirkt bakterizid auf Legionellen sowie Pneumokokken. Um Hinweise auf den Wirkmechanismus zu erhalten, wurde *L. pneumophila* Corby über 24 h und 48 h mit *B. pumilus*-Rohextrakt, Pumilacidinen A, C und E bzw. dem neuen Peptidlacton WF inkubiert und im TEM betrachtet. Im Vergleich zur MeOH-Kontrolle und unbehandelten Legionellen bewirkte der Rohextrakt eine Ablösung der Membran in großen Vesikeln bis zu 500 nm sowie das Verschwinden von Flagellen und Außenmembran-Vesikeln (OMVs, outer membrane vesicles) nach 48 h, nicht jedoch nach 24 h (Abbildung 5.24 A/a-d). Pumilacidin A, C, E sowie das Peptidlacton WF führten nach 48-stündiger Inkubation zur Plasmolyse von *Legionella* (Abbildung 5.24 B/b-f). Bei Pumilacidin E waren deformierte Zellen zu sehen und die Plasmolyse fiel gegenüber den übrigen Substanzen geringer aus. Das Peptidlacton WF wirkte als einzige Substanz bereits nach 24 h. Hier war eine Auflösung der Membran in fädige Strukturen zu erkennen (Abbildung 5.24 B/a). Mikroskopisch konnte dies für Pumilacidin A, C und E nicht gezeigt werden. Die Bestimmung der Zellzahl nach 24-stündiger Co-Inkubation in Flüssigkultur zeigte jedoch, dass diese ebenfalls drastisch abnahm. Aufgrund der geringen Substanzmenge wurden keine Tests mit Pneumokokken durchgeführt. Auffällig ist das unterschiedliche Ergebnis in Bezug auf die antimikrobielle Aktivität der Peptidlactone zwischen den Aufnahmen am TEM und der MHK-Bestimmung. TEM-Aufnahmen zeigten, dass das Peptidlacton WF die höchste Aktivität besitzt, wohingegen die MHK bei Pumilacidin C am geringsten ausfiel.

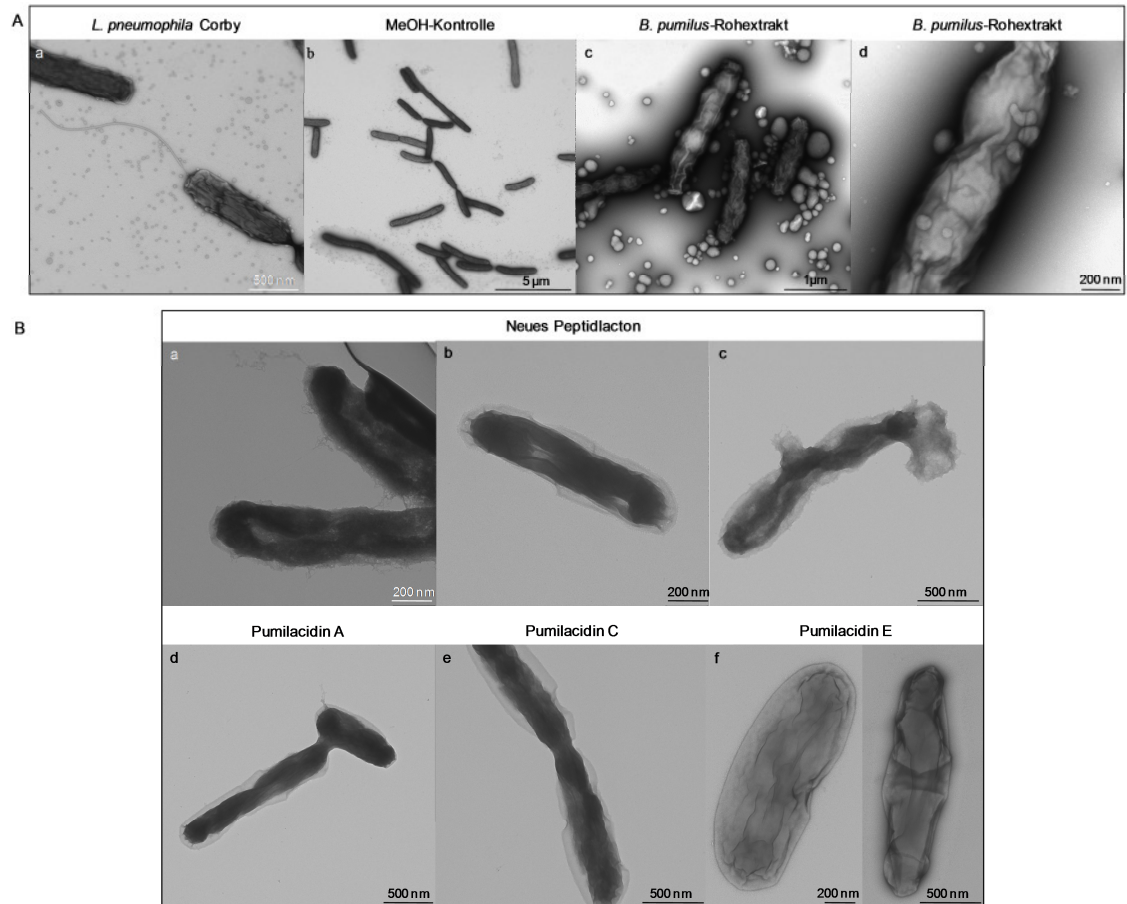


Abbildung 5.24: TEM von *L. pneumophila* nach Inkubation mit *B. pumilus*-Rohextrakt (A) sowie daraus isolierten Reinsubstanzen (B). *L. pneumophila* Corby (8×10^7 /mL) wurden für 48 h ohne Extrakt (A/a), mit MeOH (A/b) bzw. *B. pumilus*-Rohextrakt (A/c-d) bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde *Legionella* mit dem neuen Peptidlacton WF über 24 h (B/a) bzw. 48 h (B/b-c), Pumilacidin A (B/d), Pumilacidin C (B/e) oder Pumilacidin E (B/f) inkubiert. Die Bakterien wurden mit 2,5 % PFA fixiert und mit UAc kontrastiert. Die Kontrollen zeigten intakte Legionellen sowie die Produktion von OMVs. Der Rohextrakt bewirkte die Zerstörung der OMVs sowie die Bildung großer Vesikel auf der Bakterienoberfläche. Die Inkubation mit dem Peptidlacton WF führte bereits nach 24-stündiger Co-Inkubation zu einer veränderten, fädigen Membranstruktur der Bakterien. Nach 48 h lösten das Peptidlacton WF sowie Pumilacidin A und C die Plasmolyse der Zellen aus. Die Inkubation mit Pumilacidin E führte zu deformierten, dicken Legionellen und deren partieller Plasmolyse. Der Versuch wurde aufgrund limitierender Substanzmengen einmal durchgeführt.

Die TEM-Aufnahmen wiesen auf eine mögliche Membranaktivität der vier Peptidlactone hin. Mit Hilfe von SYTOX green wurde die Membranaktivität von Pumilacidin A, C, E und dem Peptidlacton bestätigt (Abbildung 5.25). SYTOX green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der lebende Zellen nicht durchdringen kann. Sobald die Plasmamembran permeabilisiert wird, dringt der Farbstoff in die Zelle und interagiert mit den Nukleinsäuren. Die Bakterien wurden über 24 h mit den jeweiligen Testsubstanzen und SYTOX green inkubiert. Als Positivkontrolle diente 1 % TritonX-100, welches bakterielle Membranen permeabilisiert und

eine maximale Fluoreszenzintensität aufwies. Im Vergleich zu unbehandelten oder mit 4 % MeOH inkubierten Legionellen erhöhte sich die Fluoreszenzintensität durch Zugabe der vier Peptidlactone, in Abhängigkeit von der eingesetzten Extraktkonzentration. Eine Konzentration von 3 μM Testsubstanz hatte keine Auswirkung auf die Zellpermeabilität. Die Inkubation mit 6 μM bzw. 12 μM bewirkte jedoch einen Anstieg der Fluoreszenzintensität gegenüber den Kontrollzellen. Diese betrug nach Inkubation mit 12 μM Extrakt 730 für das Peptidlacton WF, 709 für Pumilacidin E, 671 für Pumilacidin A und 614 für Pumilacidin C. Demnach hatten alle vier Peptidlactone einen ähnlichen Effekt auf die Membranpermeabilität der Legionellen.

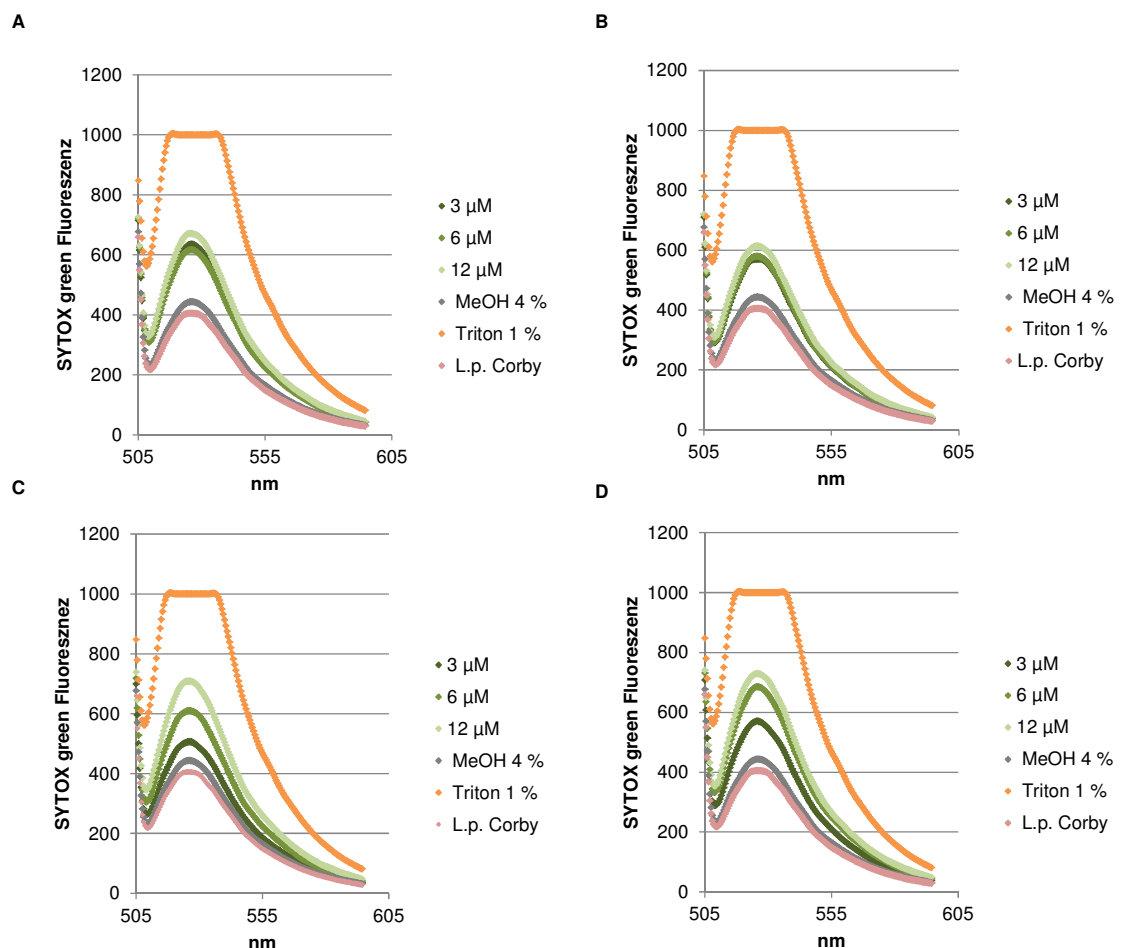


Abbildung 5.25: SYTOX green Assay zur Bestimmung der Membranpermeabilität von *L. pneumophila* Corby durch Pumilacidin A, C, E und dem neuen Peptidlacton WF aus *B. pumilus*. 4×10^7 Bakterien/mL wurden zusammen mit der jeweiligen Testsubstanz Pumilacidin A (A), Pumilacidin C (B), Pumilacidin E (C) und dem Peptidlacton WF (D) bzw. 1 % TritonX-100 (Positivkontrolle) und 4 % MeOH (Negativkontrolle) über 24 h bei 37 °C mit 4 μM SYTOX green inkubiert. Die Fluoreszenz wurde durch Anregung bei 490 nm, 10 nm Bandbreite und 500 nm/min im Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Alle vier Testsubstanzen führten zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität auf ca. 600-700 nm. Die maximale Intensität von 1000 wurde durch 1 % TritonX-100 erreicht. Legionellen ohne Testsubstanz bzw. nach Inkubation mit 4 % MeOH wiesen eine Fluoreszenzintensität von ca. 400 auf.

Aufarbeitung des Zellsediments

Der Rohextrakt des Zellsediments von *B. pumilus* DKS1 besaß im Gegensatz zum Extrakt des Kulturüberstandes keine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von *Legionella*. Der Extrakt wurde dennoch wie in Abbildung 5.26 aufgearbeitet und führte zur Isolation eines neuen Glykolipids, welches das Wachstum von *Legionella* inhibierte. Das Zellsediment wurde mittels EtOAc, Aceton und Ultraschall extrahiert. Die anschließende Isolation und Strukturaufklärung des Glykolipids wurde von Herrn Wang (Universität Göttingen) durchgeführt. Über eine Silica Gel-Säule und RP-HPLC mittels MeOH-Gradienten erfolgte die weitere Fraktionierung des Extrakts. Die anschließende Durchführung einer präparativen DC ermöglichte die Isolation eines weißen amorphen Feststoffs mit einem R_f -Wert von 0,3.

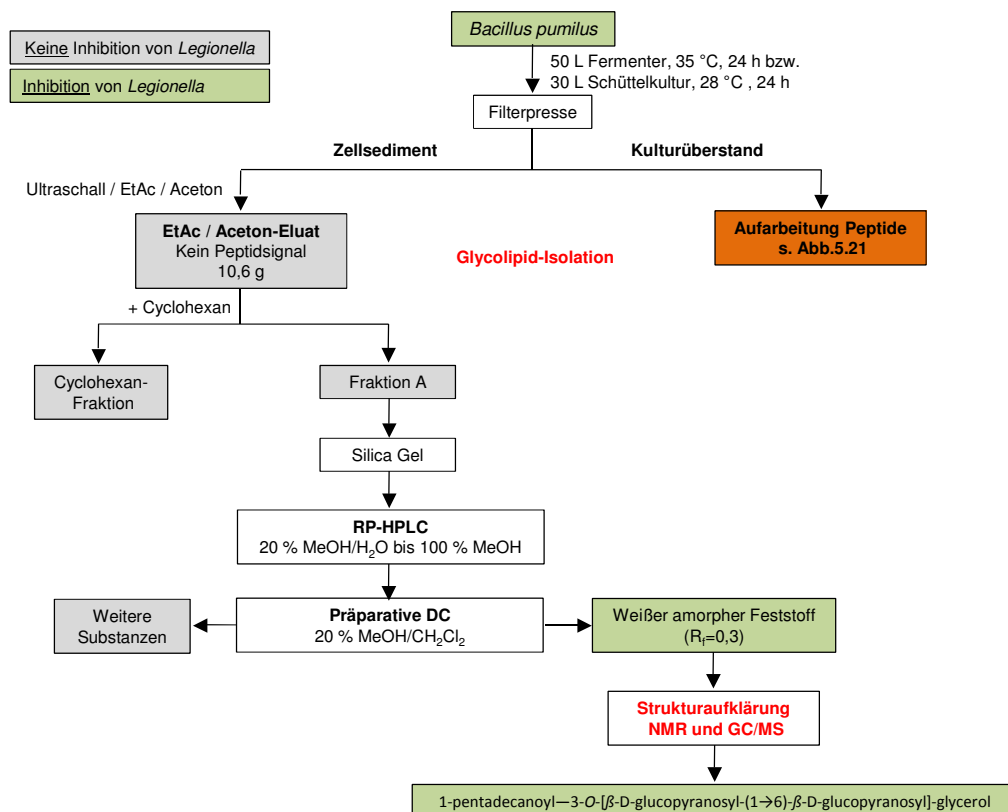


Abbildung 5.26: Isolation des neuen Glykolipids 1-pentadecanoyl—3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-glycerol aus *B. pumilus*-Zellsediment. Mit Hilfe einer Filterpresse wurden Zellsediment und Kulturüberstand der *B. pumilus*-Flüssigkultur voneinander getrennt. Die Aufarbeitung des Zellsediments erfolgte unter Ultraschallbehandlung und EtOAc sowie Aceton-Extraktion. Die weitere Aufarbeitung erfolgte durch Herrn Wang (Universität Göttingen) mittels Fraktionierung über eine Silicagel-Säule sowie RP-HPLC und einen MeOH-Gradienten (20 % MeOH/H₂O bis 100 % MeOH). Die Fraktionen wurden über präparative DC (20 % MeOH/CH₂Cl₂) aufgetrennt und auf *Legionella*-Inhibition getestet. Hierbei wurde ein weißer amorpher Feststoff mittels NMR und GC-MS als 1-pentadecanoyl—3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-glycerol identifiziert.

Diese Substanz wurde über NMR und ESI-MS ein neuartiges Glykolipid, 1-pentadecanoyl—3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-glycerol ($C_{30}H_{56}O_{14}$) identifiziert, dass nicht in den Datenbanken AntiBase sowie Chemical Abstracts aufgeführt ist (Abbildung 5.27). Im Gegensatz zum Rohextrakt wirkten 25 μ g/mL des Glykolipids bakterizid auf *L. pneumophila* Corby in Flüssigkultur. Eine Aktivität gegenüber *E. coli* HB101, *K. aerogenes* sowie *B. megaterium* wurde nicht beobachtet.

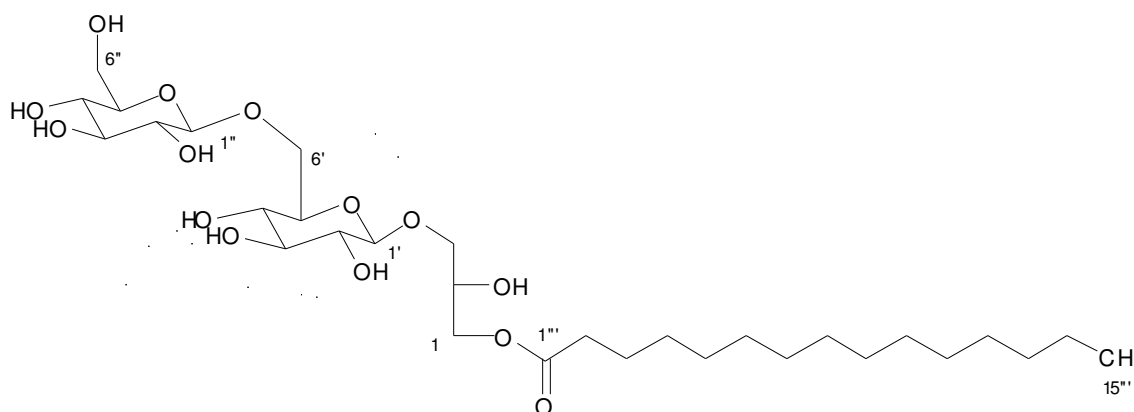


Abbildung 5.27: Struktur des neuen Glykolipids 1-pentadecanoyl—3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-glycerol aus dem Zellsediment von *B. pumilus* DKS1.

Zusammenfassung

B. pumilus DKS1 konnte mittels 16 S rRNA-Sequenzierung identifiziert werden und besaß ein sehr spezifisches inhibitorisches Spektrum gegenüber *Legionella*, *S. pneumoniae* und dem phytopathogen Pilz *M. violaceum*. Die Hemmung erfolgte nur durch Extrakte aus Kulturüberstand von Flüssigkulturen sowie durch Extrakte der Agarextraktion. Im Vergleich unterschiedlicher Kulturbedingungen lieferten die Agarextrakte höhere Ausbeuten gegenüber Flüssigextrakten. Hierbei betrug die MHK für *Legionella* 6,25 μ g/mL bzw. 25-50 μ g/mL. Die Rohextrakte aus dem Zellsediment zeigten keine Wirkung.

Auf Schafsblutagar sowie humanem Blutagar wies *B. pumilus* eine starke β -Hämolyse bzw. α -Hämolyse auf. Weiterhin führten weder die Inkubation bei stark sauren bzw. basischen pH Werten noch die Hitzebehandlung bei 121 °C zu einem Aktivitätsverlust des Rohextrakts. Die Zellviabilität von U937

Makrophagen wurde durch Inkubation mit 100 µg/mL Rohextrakt für 48 h um 30 % reduziert. Damit liegt die zytotoxische Wirkung des Rohextraktes um Faktor 16 niedriger als der bakterizide Effekt auf Legionellen und Streptokokken.

Aus dem Kulturüberstand von *B. pumilus* konnte Pumilacidin A, C und E sowie ein neues Peptidlacton WF mit der Aminosäuresequenz Glu-Leu-Leu-Asp-Leu-Leu-Val isoliert werden. Diese Substanzen inhibierten spezifisch *Legionella* (MHK 2-6 µM) sowie *S. pneumoniae* (3 µM). Andere Gram-positive (*B. megaterium*) oder Gram-negative (*E. coli*, *K. aerogenes*) Bakterien wurden durch maximal 97 µM der Reinsubstanzen nicht inhibiert.

TEM Aufnahmen nach 48-stündiger Inkubation von *L. pneumophila* Corby mit dem Rohextrakt zeigten das Verschwinden von OMVs aus der Kultur sowie die Bildung großer Vesikel bis zu 500 nm auf der *Legionella*-Oberfläche. Die Inkubation mit dem neuen Peptidlacton bewirkte bereits nach 24 h das Auflösen der Membran. Nach 48-stündiger Co-Inkubation mit dem Peptidlacton WF sowie Pumilacidin A, C und E waren eine deutliche Formveränderung der Legionellen sowie die Plasmolyse der Zellen zu erkennen.

Zusätzlich wurden Pumilacidin-ähnliche Substanzen wie „Patnam“ (Pumilacidin B ähnliche Struktur) sowie das Makrolidantibiotikum Erythromycin getestet. Beide wiesen ein analoges Hemmspektrum zu den isolierten Peptidlactonen auf. „Patnam“ sowie Erythromycin besaßen eine MHK von 6 µM bzw. 4-9 µM für *Legionella*. Diese lag damit im selben Bereich wie für Pumilacidin A und E (3 µM), Pumilacidin C (2 µM) sowie für das neue Peptid WF (6 µM).

Obwohl bis zu 800 µg/mL Rohextrakt des Zellsediments keine Hemmung von Legionellen bewirkte, konnte ein neues Glycerolipid mit einer MHK von 25 µg/mL (39 µM) für *Legionella* spp isoliert und als 1-pentadecanoyl—3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-glycerol (C₃₀H₅₆O₁₄) identifiziert werden. *E. coli*, *K. aerogenes* sowie *B. megaterium* wurden nicht durch das Glycerolipid im Wachstum beeinflusst.

5.4 Einsatz von Gentamicin-beladenen Liposomen zur Behandlung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen

In diesem Teil der Arbeit wurde am Beispiel von Gentamicin (Gm) untersucht, inwieweit sich Liposomen als Wirkstoffträgersystem für nicht membrangängige Antibiotika zur Therapie intrazellulärer *Legionella*-Infektionen eignen. Gm besteht aus einem Gemisch von strukturell sehr ähnlichen Aminoglykosidverbindungen und ist extrazellulär hoch aktiv gegen *Legionella*.

In Kooperation mit der Firma Rodos BioTarget und in Zusammenarbeit mit A. Weseloh wurden für die folgenden Versuche Gm-beladene Liposomen aus zwei unterschiedlichen Herstellungsverfahren verwendet. Beide Chargen wurden mit Rhodamin markiert. Außerdem erfolgte ein „Coating“ der Liposomen mit Zuckerresten, die spezifisch an C-Typ Lektin-Rezeptoren Antigen-präsentierender Zellen binden. Die Herstellung der Liposomen erfolgte entweder über das Verfahren der „reversed phase evaporation“ (REV) oder durch „dual asymmetric centrifugation“ (DAC). DAC-Liposomen (DAC-LS) wurden in zwei verschiedene Präparationen aufgeteilt. Eine Charge enthielt sowohl intra- als auch extrazelluläres Gm (DAC-LS-in/ex) und die zweite Charge nur intrazelluläres Gm (DAC-LS-in). Hier wurde das extrazelluläre Gm durch Dialyse abgetrennt. Mittels ELISA wurde die jeweilige Beladungseffizienz der Liposomen ermittelt (Rodos BioTarget).

Sowohl REV-Liposomen (REV-LS) als auch DAC-LS wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella* in U937- und THP-1-Makrophagen sowie NCI-H292 Lungenepithelzellen untersucht.

5.4.1 Qualitätskontrolle und Zytotoxizität von Liposomen

Vor der Verwendung der Liposomen für Infektionsstudien erfolgte zunächst eine Qualitätskontrolle der jeweiligen Chargen. Die Qualität wurde zunächst durch Bestimmung des Lipidgehalts und des hydrodynamischen Durchmessers sichergestellt (M. Holzer, Pharmazeutische Technologie Universität Freiburg). Zusätzlich wurden die Integrität, Größe und Form sowie Reinheit der Liposomen am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) überprüft. Die Aufnahmen wurden von Manfred Rohde (Helmholtz-Zentrum für

Infektionsforschung, Braunschweig) angefertigt und zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Herstellungsverfahren DAC und REV. In Abbildung 5.28 A sind TEM-Aufnahmen von REV-LS dargestellt. REV-LS waren einheitlich rund geformt und besaßen einen Durchmesser von 100-200 nm. Auffällig war die Bildung von Aggregaten aus 5-50 einzelnen LS. Die Produktion über das DAC-Verfahren lieferte Liposomen unterschiedlicher Form mit großen Schwankungen im Liposomendurchmesser von 50-200 nm (s. Abbildung 5.28 B). Der mikroskopisch ermittelte Durchmesser zeigte starke Abweichungen zum hydrodynamischen Durchmesser, der ca. 125 nm betrug. Darüber hinaus waren viele DAC-LS schlauchförmig oder nicht vollständig geschlossen.

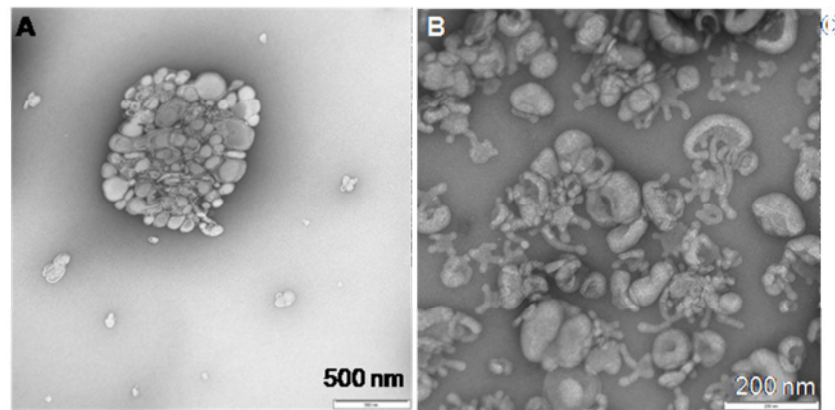


Abbildung 5.28: TEM-Aufnahmen von REV-LS und DAC-LS. Liposomen wurden über das REV-Verfahren (A) bzw. DAC-Verfahren (B) hergestellt und mit Rhodamin B-PE markiert. REV-LS besaßen einen einheitlichen Durchmesser von ca. 100-200 nm, waren gleichmäßig geformt und intakt. DAC-LS waren ungleichmäßig geformt und bildeten Schläuche oder teilweise geöffnete Vesikel mit Durchmessern zwischen 50-200 nm.

Um einen Anhaltspunkt für die benötigte Gm-Konzentration in den Liposomen zu erhalten, wurde zunächst die MHK von Gm für *Legionella* in Flüssigkultur bestimmt. Versuche mit extrazellulären Legionellen zeigten, dass 31,25 µg/mL Gm benötigt wurden, um 1×10^7 Legionellen pro Milliliter innerhalb von 1 h vollständig abzutöten. Dies bedeutet, dass für die intrazelluläre Anwendung bei einer Beladungseffizienz von 40 % (DAC-LS) bzw. 10 % (REV-LS) sowie einer Aufnahmerate der Liposomen in Makrophagen von ca. 70 % innerhalb von 2 h mindestens eine Gesamtkonzentration (Gm verkapselt + extrazellulär) von 112 µg/mL bzw. 450 µg/mL eingesetzt werden sollte.

Aufgrund der damit verbundenen hohen extrazellulären Antibiotikakonzentration wurde zunächst die Zytotoxizität von Gm auf U937, THP-1 und NCI-H292 untersucht. Hierfür wurden Makrophagen bzw. Epithelzellen für 1-2 h mit 1 mg/mL extrazellulärem Gm, mit Rhodamin-markierten und Gm-beladenen REV-LS-in/ex (1 mg/mL Gm-Gesamtkonzentration) sowie mit 25 % DMSO inkubiert. DMSO wirkt zytotoxisch auf Zellen und diente als Negativkontrolle. Im Anschluss wurde die Zytotoxizität mittels Alamar blue bei 595 nm ermittelt. Freies Gm und REV-LS-in/ex wirkten nicht zytotoxisch auf U937- und THP-1 Makrophagen bzw. NCI-H292. Die Zellviabilität lag für alle drei Zell-Linien über 90 %. Eine Co-Inkubation mit 25 % DMSO führte hingegen zur Abnahme der Zellvitalität um ca. 50-55 % (Abbildung 5.29 A und B).

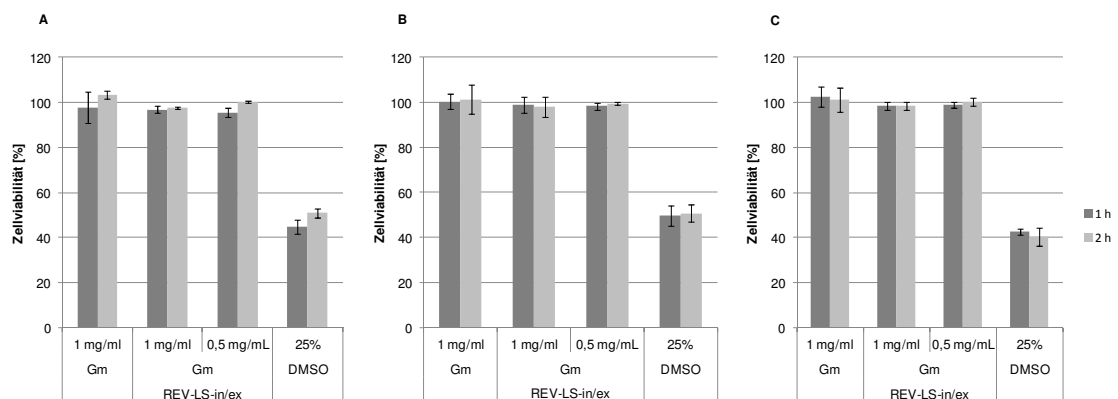


Abbildung 5.29: Zytotoxische Wirkung von Gentamicin, von Gentamicin beladenen und mit Rhodamin markierten REV-Liposomen sowie DMSO auf die Lungenepithelzellen und Makrophagen. 6×10^4 U937 (A), THP-1 (B), NCI-H292 (C) wurden pro 96-well für 1 bzw. 2 h mit freiem Gm, mit Rhodamin-PE markierten REV-LS-in/ex sowie 25 % DMSO bei 37 °C inkubiert. Die Zytotoxizität wurde mittels Alamar blue bei 595 nm bestimmt. 1 mg/mL freies Gm sowie REV-LS-in/ex mit einer Gm-Gesamtkonzentration von 1 mg/mL waren nicht zytotoxisch für die Zellen. Die Inkubation mit 25 % DMSO reduzierte die Zellviabilität um 50-60 %. Der Graph gibt Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten an.

5.4.2 Aufnahmeverhalten von Liposomen

In Abschnitt 5.4.1 konnte die zytotoxische Wirkung von 1 mg/mL freiem Gm sowie von REV-LS-in/ex ausgeschlossen werden. Anschließend wurde die Bindung und Aufnahme an Makrophagen sowie Lungenepithelzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und konfokaler Mikroskopie zwei Stunden nach Liposomen-Zugabe untersucht. Die Aufnahmen am konfokalen Mikroskop bilden eine Zellebene ab und zeigen deutlich, dass sich REV-LS innerhalb der

Makrophagen Zell-Linien U937 und THP-1 befinden (Abbildung 5.30 A+B). Z-Stapel Aufnahmen beider Makrophagen Zell-Linien zeigten weiterhin, dass eine ungleichmäßige Verteilung der Liposomen innerhalb der Zelle vorliegt und nicht jede Zelle Liposomen aufgenommen hat (nicht abgebildet). Bei Betrachtung der NCI-H292-Präparate fiel auf, dass die Lungenepithelzellen nicht in der Lage waren Liposomen aufzunehmen (Abbildung 5.30 C+D). REV-LS zeigten eine starke Adhäsion an die Zellmembran, konnten jedoch nicht im Inneren der Zelle beobachtet werden. Kontrollpräparate aller Zell-Linien ohne Liposomenzugabe wiesen keine rote Fluoreszenz auf (nicht dargestellt).

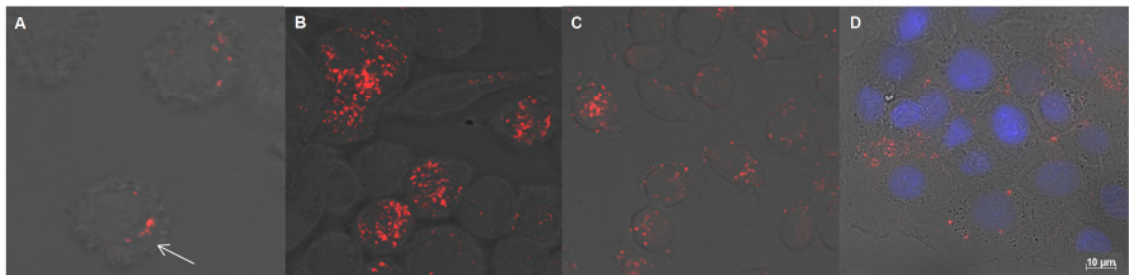


Abbildung 5.30: Adhäsion und Aufnahme von REV-LS in U937, THP-1 und NCI-H292. U937 Makrophagen (A) und THP-1 Makrophagen (B) sowie NCI-H292 Lungenepithelzellen (C+D) wurden für 2 h mit Rhodamin-PE markierten REV-LS (rot) inkubiert. Die Betrachtung der Präparate erfolgte am konfokalen Mikroskop (A-C) oder am Fluoreszenzmikroskop (D). Liposomen adhärten spezifisch an die Oberfläche von NCI-H292 Lungenepithelzellen. Die Aufnahme in die Zelle erfolgte jedoch nur in U937 (weißer Pfeil) und THP-1, nicht jedoch in NCI-H292. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau).

Weiterhin war es von Interesse das Verteilungsverhalten des verkapselten Gentamicins in der Zelle zu analysieren. Hierfür wurden U937 Makrophagen zwei Stunden mit Rhodamin markierten DAC-LS-in inkubiert und ungebundene Liposomen durch Waschschriffe entfernt. Extrazelluläres Gm wurde bei DAC-LS-in zuvor durch Dialyse abgetrennt. Anschließend wurden Immunfluoreszenzstudien mit einem Gm-Antikörper durchgeführt, um das durch die Liposomen freigesetzte Antibiotikum zu detektieren. In Abbildung 5.31 B sind die Liposomen (rot) deutlich innerhalb der Makrophagen zu erkennen. Das freigesetzte Gentamicin erscheint durch den verwendeten Sekundärantikörper grün und wurde an und in den Makrophagen detektiert. Unbehandelte Kontrollzellen fluoreszierten ebenfalls grün. Im Vergleich mit den Liposomen-Präparaten fiel dies Fluoreszenz jedoch wesentlich schwächer aus (Abbildung 5.31 A).

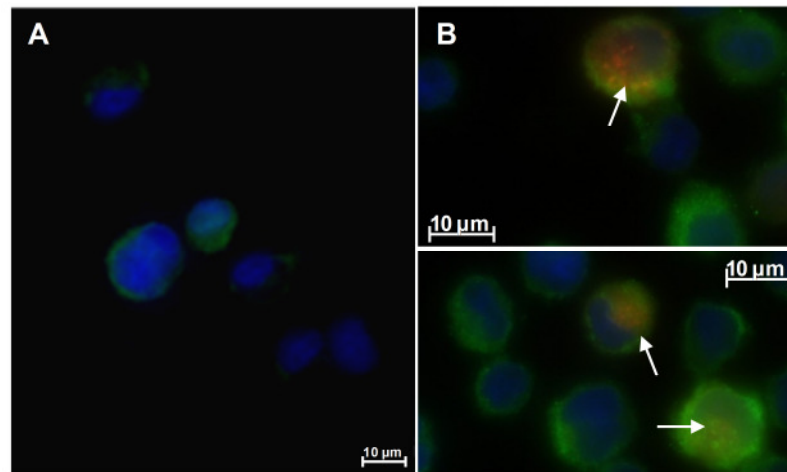


Abbildung 5.31: Immunfluoreszenzmikroskopie von U937 Makrophagen nach Inkubation mit Gm-beladenen DAC-LS-in. U937 Makrophagen wurden für 2 h ohne Gm (A) oder mit Rhodamin-PE markierten und mit Gm-beladenen DAC-LS-in (50 µL/500 µL Medium) inkubiert (B). Die Zellen wurden mit PFA fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Gm wurde mittels Gm-AK konjugiert und mit Alexa 488 als Sekundärantikörper visualisiert (grün). Die anschließende Betrachtung der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Die Kontrollpräparate weisen eine schwache grüne Fluoreszenz auf. DAC-LS-in wurden durch die Makrophagen aufgenommen und erscheinen durch die Überlagerung des roten und grünen Signals gelb (weißer Pfeil). Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle zeigten die mit Liposomen behandelten Zellen eine wesentlich stärkere grüne Fluoreszenz, Maßstab, 10 µm.

5.4.3 Behandlung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen mit Liposomen

Nachdem im vorausgehenden Kapitel die Aufnahme von Liposomen in Makrophagen gezeigt werden konnte, sollte nun der Einfluss Gentamicin-beladener REV-LS und DAC-LS auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella* über 24 h untersucht werden. Da Liposomen von Lungenepithelzellen zwar gebunden, aber nicht aufgenommen werden konnten, wurden mit diesem Zelltyp keine Infektionsstudien durchgeführt. Vielmehr konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Makrophagen-Zell-Linien U937 und THP-1, die in der Lage waren Liposomen zu binden und aufzunehmen. Die Infektionen wurden wie in Abschnitt 4.7.1 beschrieben durchgeführt und die Wirkung von REV-LS und DAC-LS sowie extrazellulärem Gm auf den Infektionsverlauf untersucht. DAC-TS wurden in zwei verschiedenen Varianten eingesetzt. Ausgehend von DAC-LS mit extra- und intrazellulärem Gm (DAC-LS-in/ex) wurde über Dialyse eine Charge ohne extrazelluläres Gm (DAC-LS-in) hergestellt. Die Gm-Gesamtkonzentration der DAC-LS-in/ex betrug 11,5 mg/mL. Da die exakte Gm-Konzentration der DAC-LS-in nicht bekannt war, wurde die benötigte Gm-Konzentration anhand der Lipidkonzentrationen

der beiden Chargen errechnet. Letztlich wurde von beiden LS-Chargen die gleiche Lipidkonzentration eingesetzt. Die Verkapselungsrate der DAC-LS betrug ca. 40-50 %. REV-LS besaßen eine Gm-Gesamtkonzentration von 50 mg/mL. Die Verkapselungsrate lag zwischen 10-15 %, wobei das extrazelluläre Gm nicht abgetrennt wurde. Um in Infektionsstudien dieselben intrazellulären Gm-Konzentrationen durch REV-LS zu erreichen, wurde die fünffache Menge an REV-LS eingesetzt. Konzentrationen ≥ 1 mg/mL Gm veränderten den pH-Wert des Mediums und führten zum Ablösen der infizierten Zellen vom Boden der 24-Wellplatte. Daher wurden in den folgenden Versuchen nur Konzentrationen bis zu 1 mg/mL Gm-Gesamtkonzentration verwendet.

Behandlung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen mit DAC-LS

In Abbildung 5.32 zeigt die Wirkung von DAC-LS-in/ex und DAC-LS-in im Vergleich zu freiem Gm auf die Vermehrung von Legionellen in U937-Makrophagen.

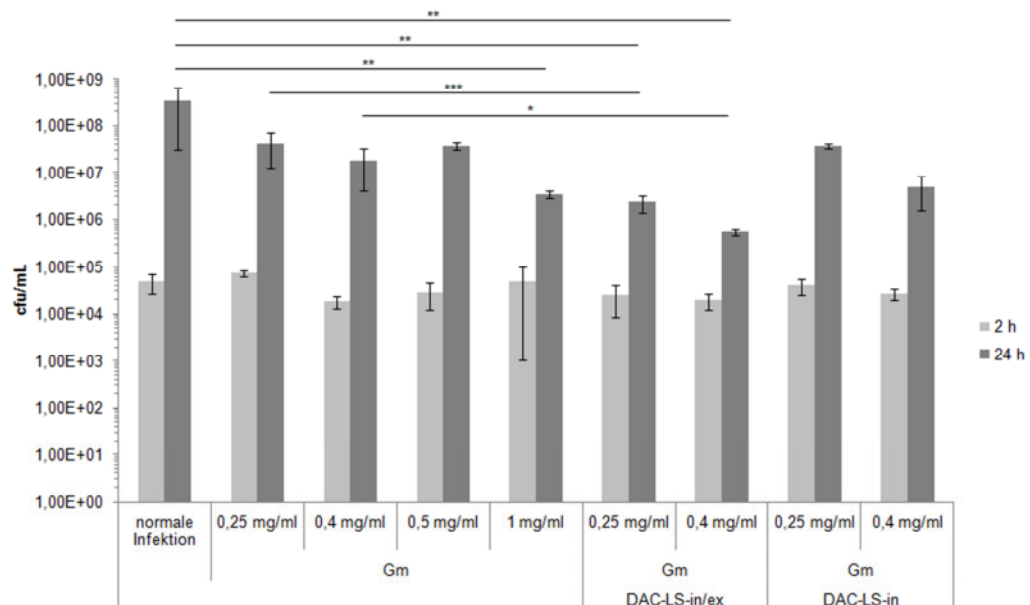


Abbildung 5.32: Wirkung von freiem Gm, Gm-beladenen DAC-LS-in/ex und DAC-LS-in auf *Legionella*-Infektionen in U937-Makrophagen. U937-Makrophagen wurden für 2 h mit *L. pneumophila* Corby infiziert und anschließend für 2 h mit freiem Gm bzw. mit DAC-LS-in/ex (verkapseltes und freies Gm) oder DAC-LS-in (verkapseltes Gm) inkubiert. Die Zugabe von DAC-LS-in/ex reduzierte die Vermehrung von *Legionella* nach 24-stündiger Infektion um ca. 1 log-Stufe ($p \leq 0,001$) im Vergleich zur Kontrollinfektion mit 250 μ g/mL bzw. 400 μ g/mL freiem Gm. Die Zugabe von 1 mg/mL freiem Gm für 2 h führte ebenfalls zu einer verlangsamten Vermehrung der Bakterien. Der Graph gibt Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten an. * zeigen die p -Werte an. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ (t-Test).

Abbildung 5.32 zeigt deutlich, dass direkt nach der 2-stündigen Inkubation mit Liposomen keine Abnahme der Bakterienzahl gegenüber der normalen Infektion bzw. den Kontrollen mit freiem Gm auftritt. Die Bakterienzahl lag jeweils bei ca. $4,5 \times 10^4$ cfu/mL. Deutliche Unterschiede waren erst 24 h Stunden nach der Infektion zu erkennen. Die Vermehrung bei einer normalen Infektion lag zwischen 3-3,5 log-Stufen. Die 2-stündige Zugabe von 0,25-0,5 mg/mL freiem Gm zu infizierten Zellen resultierte in einer geringfügigen Abnahme der Vermehrung um 1 bzw. 1,5 log-Stufen. Ab einer extrazellulären Gm-Konzentration von 1 mg/mL wurde die Replikation signifikant ($p \leq 0,001$) um 2 log-Stufen reduziert. Im Vergleich mit den zugehörigen Gm-Kontrollen nahm die Vermehrung durch Zugabe von 250 µg/mL DAC-LS-in/ex ($p \leq 0,001$) bzw. 400 µg/mL DAC-LS-in/ex ($p \leq 0,1$) signifikant um eine weitere bzw. 1,5 log-Stufen ab. Die Behandlung mit DAC-LS-in, bei denen das extrazelluläre Gm mittels Dialyse entfernt wurde, hatte im Vergleich zu den Gm-Kontrollen keinen zusätzlichen Einfluss auf die Vermehrung und entsprach mit 1 bzw. 1,5 log-Stufen den Kontroll-Infektionen mit 0,25 bzw. 0,4 mg/mL Gm. Die exakte, intrazelluläre Gm-Konzentration der dialysierten Liposomen war nicht bekannt. Sie wurde über die bekannte Lipidkonzentration an die ursprüngliche Charge angeglichen. Es lagen keine Informationen zu der Intaktheit und Stabilität der dialysierten Charge vor.

Behandlung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen mit REV-LS

Die Infektionsstudien mit REV-LS wurden ebenfalls mit U937 sowie THP-1 Makrophagen durchgeführt und sind in Abbildung 5.33 dargestellt. Da in REV-LS nur 10 % des Gm verkapselt vorliegt, mussten diese mit 1 mg/mL Gm-Gesamtkonzentration eingesetzt werden, um denselben Effekt wie durch die DAC-LS-in/ex (50-60 % verkapselt) zu erzielen.

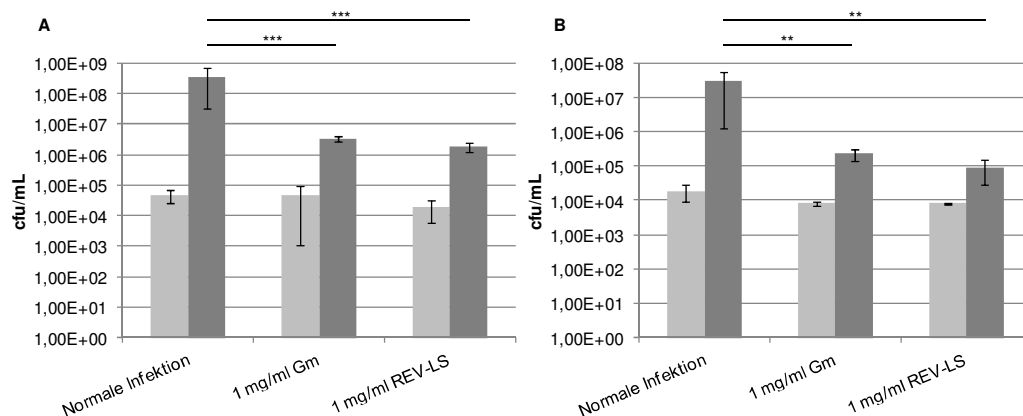


Abbildung 5.33: Behandlung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen in U937 (A) und THP-1 (B) mit Gm-beladenen REV-LS. Makrophagen wurden für 2 h mit *L. pneumophila* Corby infiziert und anschließend für 2 h mit 1 mg/mL freiem Gm oder mit REV-LS einer Gm-Gesamtkonzentration von 1 mg/mL inkubiert. Im Vergleich zur normalen Infektion reduzierte die Zugabe von 1 mg/mL freiem Gm sowie von REV-LS die Vermehrung um ca. 2 log-Stufen bei U937 ($p \leq 0,001$) und THP-1 ($p \leq 0,01$). Zwischen der Behandlung mit REV-LS und dem Einsatz von freiem Gm war kein Unterschied zu beobachten. Der Graph gibt Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten an. * zeigen die p -Werte an. ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ (t-Test).

Kontrollversuche mit 1 mg/mL freiem Gm führten bereits zur Ablösung infizierter Zellen vom Boden der 24-Wellplatte und zu einer reduzierten Vermehrung der Bakterien. Im Vergleich zur normalen Infektion wurde die Bakterienzahl sowohl durch REV-LS als auch durch 1 mg/mL freies Gm signifikant um 2 log-Stufen in U937 ($p \leq 0,001$) und THP-1 ($p \leq 0,01$) verringert. Liposomen mit Gm-Konzentrationen unter 1 mg/mL hatten keinen Effekt auf die Vermehrung (nicht dargestellt).

Zusammenfassung

Liposomen wurden über das Verfahren der „reverse phase evaporation“ bzw. „dual asymmetric centrifugation“ hergestellt und mit Gm beladen. Wie durch Transmissionselektronenmikroskopie gezeigt wurde, waren REV-LS intakt, gleichmäßig rund geformt und besaßen einen Durchmesser von 100-200 nm. Die Produktion von DAC-LS lieferte Vesikel unterschiedlicher Form und Größe, wobei der Durchmesser zwischen 50 nm und 200 nm betrug. Extrazelluläres Gm wurde in beiden Chargen nicht abgetrennt. Da die Beladungseffizienz von DAC-LS 40 %, die von REV-LS nur 10 % betrug, mussten relativ hohe extrazelluläre Gm-Konzentrationen zur Behandlung intrazellulärer *Legionella*-

Infektionen eingesetzt werden. Zytotoxizitätsanalysen mittels Alamar blue und freiem Gm zeigten, dass eine Gm-Konzentration > 1 mg/mL zytotoxisch für U937-Makrophagen sowie für die NCI-H292 Lungenepithelzellen war. Die Liposomen besaßen selbst keine toxische Wirkung. Mit Hilfe von Rhodamin markierten Liposomen konnte durch Fluoreszenzmikroskopie deren Bindung an Makrophagen und Lungenepithelzellen gezeigt werden. Die Aufnahme von Liposomen erfolgte jedoch nur durch U937-Zellen. Dies konnte durch konfokale Mikroskopie sowie die Markierung von Gm mittels Antikörper gezeigt werden. Die Zugabe von DAC-LS-in/ex (250 μ g/mL Gm) reduzierte die Vermehrung von *Legionella* nach 24-stündiger Infektion um 1 log-Stufe im Vergleich zur Kontrollinfektion mit 250 μ g/mL extrazellulärem Gm. Bei Einsatz von Gm-Konzentrationen unter 1 mg/mL erfolgte ein „normaler“ Infektionsverlauf, wobei die Vermehrung der Legionellen nach 24 h vier log-Stufen betrug. Der Einsatz geringerer Liposomenkonzentrationen hatte keinen Einfluss auf die bakterielle Vermehrung. Da 1 mg/mL extrazelluläres Gm die Vermehrung ebenfalls reduzierte, konnten REV-LS durch ihren hohen Anteil an extrazellulärem Gm nicht für Infektionen verwendet werden.

6 Diskussion

6.1 Infektion von humanen Zellen und Zell-Linien mit *L. pneumophila*

L. pneumophila besitzt eine Vielzahl von Virulenzfaktoren und ist in der Lage ein breites Wirtsspektrum zu infizieren. Im natürlichen Habitat vermehren sich Legionellen bevorzugt in Protozoen. Die Inhalation *Legionella*-haltiger Aerosole kann jedoch auch beim Menschen eine Infektion hervorrufen und verursacht in Deutschland jährlich bis zu 20.000 Pneumonien. Trotz vorhandener Therapiemöglichkeiten über Makrolide oder Chinolone liegt die Letalität bei ca. 7-10 % (Brodhun & Buchholz, 2011).

Um neue Behandlungsansätze zu finden, ist es daher notwendig die Interaktion von Legionellen mit den verschiedenen Wirtszellen zu verstehen. In dieser Arbeit wurden verschiedene an der *Legionella*-Infektion beteiligte Zellen sowie der Einfluss unterschiedlicher Opsonisierungsfaktoren in Infektionsstudien untersucht. Dies ermöglichte den direkten Vergleich zwischen der Makrophagen Zell-Linie U937 mit primären M Φ , der Lungenepithel Zell-Linie NCI-H292 und PMNs.

Lungenepithelzellen gehören im Gegensatz zu PMNs und Makrophagen nicht zu den professionellen Phagozyten. Sie bilden jedoch eine Lungenepithelzellbarriere aus und verhindern das Eindringen von Erregern in das darunter liegende Gewebe. Durch die Produktion von antimikrobiellen Peptiden und inflammatorischen Zytokinen tragen sie zur Anlockung und Aktivierung weiterer Immunzellen an den Infektionsort und damit entscheidend zur Pathogenabwehr bei (Scharf *et al.*, 2010). Infektionsstudien dieser Arbeit zeigten, dass *L. pneumophila* Corby nur bedingt von NCI-H292 aufgenommen wird. Da sich keine Komplement- oder Fc-Rezeptoren auf den Lungenepithelzellen befinden, führte weder die Opsonisierung mit Serum noch mit Antikörpern zu einer erhöhten Aufnahme des Erregers. Neuere Studien belegen, dass filamentöse *L. pneumophila* an E Cadherin und β 1-Integrin-Rezeptoren binden. Die Aktivierung der Rezeptoren führt schließlich zur

Internalisierung über einen Zipper-ähnlichen Prozess und wird aktiv durch die Bakterien ausgelöst (Parashar *et al.*, 2012). Die anschließende Vermehrung der Legionellen um 3-3,5 log-Stufen verlief sehr effizient. Ähnliche Beobachtungen machten Teruya *et al.* bei der Infektion von NCI-H292 sowie A549 mit *L. pneumophila* AA100jm (MOI 100) (Teruya *et al.*, 2007, 2011). Die gute Vermehrung kann auf fehlende Abwehrmechanismen wie z.B. die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Vernichtung intrazellulärer Pathogene zurückgeführt werden.

Im Unterschied zu Lungenepithelzellen zeigten U937-Makrophagen sowie zu Makrophagen ausdifferenzierte mononukleare Zellen aus peripherem Blut (MΦ) eine gute Aufnahme von *L. pneumophila* mit einer anschließenden bakteriellen Vermehrung um 1-1,5 log-Stufen. Hierbei fiel die Aufnahme in MΦ generell höher als bei U937-Zellen aus. Die Opsonisierung mit Komplement allein hatte keinen Einfluss auf die Phagozytose oder den weiteren Infektionsverlauf in den Makrophagen. Unterschiede in Hinblick auf die Infektion der Zell-Linie bzw. den primären Zellen waren minimal und wurden lediglich anhand der verbesserten Aufnahme von zuvor mit Lp-AK opsonisierten Legionellen in MΦ deutlich (s. Abbildung 5.1). Die Ursache hierfür könnten Unterschiede im Rezeptorprofil der Zellen sein. So zeigen periphere Makrophagen gegenüber U937 und alveolaren Makrophagen u.a. eine verminderte Ausbildung der Komplementrezeptoren CR1 und CR3 (Gilbert *et al.*, 1985, Sheth *et al.*, 1988). Da die Aufnahmerate bei MΦ nach Opsonisierung mit Lp-AK erhöht wurde, kann von einer Bindung der Lp-AK an Fc-Rezeptoren der Makrophagen ausgegangen werden. Interessant war in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass eine Opsonisierung mit humanem Immunsrum (MAb 3/1) die Replikation in U937 verhinderte. Der Antikörper Mab 3/1 erkennt spezifisch Epitope der Legionaminsäure, einem besonderen Bestandteil der *Legionella* LPS. Mit Lp-AK (Kaninchen) opsonisierte *L. pneumophila* vermehrten sich hingegen um 1-1,5 log-Stufen in 24 h. Dies entspricht der Vermehrung von *L. pneumophila* ohne vorherige Opsonisierung. Der im Kaninchen produzierte AK ist demnach nicht in der Lage, Effektormechanismen von humanen Makrophagen zu aktivieren. Möglicherweise findet keine Bindung des Lp-AK an Fc-Rezeptoren statt. Dagegen spricht jedoch die signifikant erhöhte

Phagozytose bei MΦ. Die tatsächliche Bindung der Lp-AK an Fc-Rezeptoren der betrachteten Makrophagen sollte hierfür mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Im Rahmen detaillierter Studien mit Mausmakrophagen wiesen Joller *et al.*, 2010 eine FcR-abhängige Inhibition der *Legionella*-Replikation nach. Die protektive Wirkung konnte hierbei dem Fc-Fragment zugeordnet werden. Das F(ab')²-Fragment allein hatte hingegen keine protektive Wirkung. Durch die Bindung von AK an Fc-Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche werden Signalkaskaden aktiviert, die die Zelle resistenter gegenüber *Legionella*-Replikation machen. Trotz funktionsfähigem Typ IV B SS sind die Legionellen nicht mehr in der Lage eine replikative Nische zu etablieren, da durch die Aktivierung von Fc-Rezeptoren eine schnelle Aktivierung weiterer Signalkaskaden im Wirt ausgelöst wird (Joller *et al.*, 2010). Den *Legionella*-Effektoren bleibt nicht genügend Zeit, um in die Signalkaskaden der Wirtszelle einzugreifen und eine replikative Nische zu etablieren (s. Abbildung 6.1). Vermutlich findet ein ähnlicher Ablauf auch bei U937-Infektionen dieser Arbeit statt, die zuvor mit Immunserum opsonisierte Legionellen aufgenommen haben (s. Abbildung 6.1).

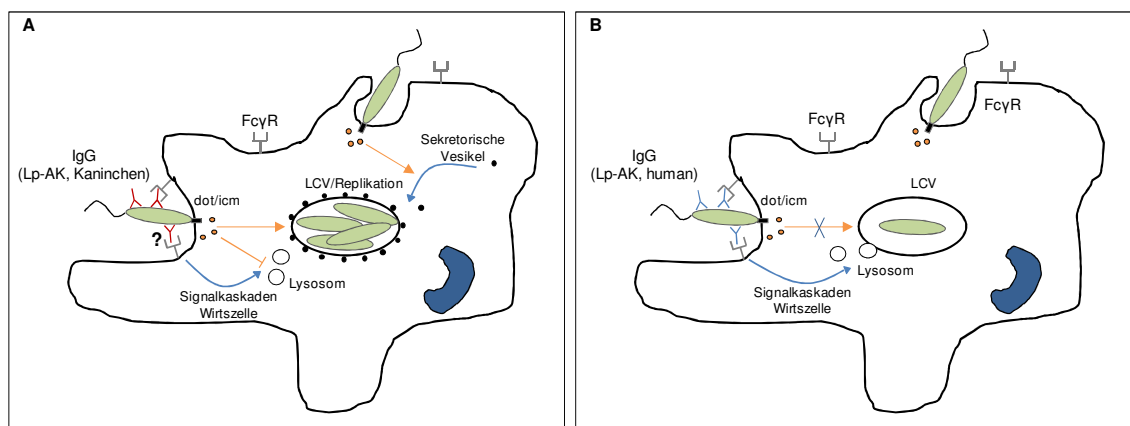


Abbildung 6.1: Einfluss von Lp-AK bzw. humanem Immunserum auf die Vermehrung von *L. pneumophila* in humanen Makrophagen. Die Opsonisierung mit Lp-AK (Kaninchen) führt zur anschließenden Vermehrung der Bakterien. Möglicherweise findet eine Bindung an FcγR-Rezeptoren statt. Wirtssignalkaskaden zur Degradation der Bakterien werden hierdurch nicht aktiviert (A). Wird *L. pneumophila* hingegen mit humanem Immunserum (Mab 3/1) opsonisiert, können die Bakterien keine replikative Nische etablieren. Die Bindung von AK an die FcγR-Rezeptoren löst eine schnelle Aktivierung von Signalkaskaden aus, die eine bakterielle Replikation verhindert (B).

6.1.1 Die Bedeutung von PMNs für die Infektion mit *L. pneumophila*

Seit der Identifikation des Krankheitserregers *L. pneumophila* im Jahr 1978 wurden zahlreiche Studien zur Pathogen-Wirts-Interaktion durchgeführt. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Infektion von Makrophagen und Monozyten sowie verschiedenen Protozoen als natürliche Wirtszellen. *In vivo* Infektionen im Meerschweinchen- und Mausmodell verdeutlichen jedoch, dass die Wechselwirkungen von Legionellen mit dem Immunsystem wesentlich komplexer sind und sich nicht allein auf Makrophagen und Monozyten beschränken. Im Zeitraum 24-48 h findet ein starker Influx von Neutrophilen und DC in das betroffene Lungengewebe von Meerschweinchen und Mäusen statt. Die Depletion der jeweiligen Zellpopulation verschlechtert die bakterielle Clearance erheblich und löst eine schwere systemische Infektion bei den Tieren aus (Fitzgeorge *et al.*, 1988, Takeda *et al.*, 2001, Ang *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu Makrophagen können sich Legionellen weder in DC noch in PMNs vermehren. Gewebepräparate aus Meerschweinchen zeigen außerdem, dass Neutrophile größtenteils tote Bakterien enthalten und die Vermehrung von Legionellen hauptsächlich in den alveolaren Makrophagen und Monozyten stattfindet (Dowling *et al.*, 1992, Nogueira *et al.*, 2009). Da PMNs vor allem zu frühen Infektionszeitpunkten von Bedeutung sind und bekannt ist, dass die meisten *L. pneumophila*-Spezies ohne AK nicht phagozytiert werden (Steffensen *et al.*, 1985), ist ihre Beteiligung an der direkten *Legionella*-Abwehr im frühen Stadium der Infektion fraglich. Möglicherweise besitzen PMNs hier eine unterstützende Funktion, indem sie durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen zur Anlockung weiterer Immunzellen und deren Aktivierung beitragen (Soehnlein *et al.*, 2008, Silva, 2010). Aktivierte PMNs stellen außerdem den Eisenchelator Apolactoferrin für infizierte Phagozyten bereit. Dieser konkurriert mit *Legionella*-Siderophoren um Eisen, einen limitierenden Wachstumsfaktor für Legionellen (Horwitz & Clemens 1999, Byrd & Horwitz, 2000). Im Gegensatz zur Aufnahme durch Makrophagen, Epithelzellen oder Dictyostelien bestätigten Versuche dieser Arbeit, dass die Aufnahme von *L. pneumophila* Corby in PMNs nur bei vorheriger Opsonisierung mit Lp-AK stattfindet. Aus der Literatur geht hervor, dass die Bedingungen hierbei stark von dem verwendeten *Legionella*-Stamm und der Serogruppe abhängen. So findet die Aufnahme von *L. micdadei* auch bei alleiniger Opsonisierung mit huS

statt während *L. pneumophila* Sg3 ohne vorherige Opsonisierung phagozytiert wird (Steffensen *et al.*, 1985). In dieser Arbeit führte die Opsonisierung von *L. pneumophila* Corby mit 1% Lp-AK zu einer nahezu 100%igen Aufnahme in die PMNs. Dies bestätigt die Ergebnisse für *L. pneumophila* Phil I aus der Studie von Verbrugh *et al.*, 1985 und widerlegt die Annahme von Horwitz & Silverstein 1981, dass Komplement und AK zwingend für die Phagozytose von *L. pneumophila* Sg1 notwendig seien. Weiterhin zeigten detaillierte Infektionsstudien über 4 h, dass innerhalb der ersten 35-60 min nach Infektion ein starker Abbau der phagozytierten Legionellen stattfindet. Dieser stagnierte jedoch und ein Teil der Bakterien überlebte. Avirulente *E. coli* HB101 wurden hingegen vollständig abgetötet. Diese Ergebnisse entsprechen Beobachtungen von Donowitz *et al.* 1990. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass 30 min nach Infektion mit *L. micdadei* ebenfalls ein inaktiver Phänotyp bei den PMNs ausgebildet wird. Dieser zeichnet sich durch eine verringerte Chemotaxis, Phagozytose und bakterizide Aktivität der Leukozyten aus (Horwitz & Silverstein 1981, Donowitz *et al.*, 1990). Studien zeigten mehrfach, dass inaktivierte PMNs u.a. eine geringere Induktion von O_2^- und Ca^{2+} nach Stimulation mit fMLP aufweisen. Im Gegensatz zu virulenten *L. pneumophila* können avirulente Legionellen die intrazelluläre Ca^{2+} -Antwort auf den Faktor fMLP, zentral zu vielen Signaltransduktionskaskaden, nur zu Beginn der Infektion verhindern. Die Phagozytose von *E. coli* führt nicht zu einem Anstieg von Ca^{2+} als Reaktion auf fMLP (Dowling *et al.*, 1992). Virulente Legionellen scheinen somit aktiv in die Signaltransduktion von PMNs einzugreifen und die Ausbildung des inaktivierten Phänotyps hervorzurufen. Nach derzeitigem Wissensstand sind hieran die saure Phosphatase AP₂, ein hitzestabiles Toxin sowie die Protease Msp/ProA beteiligt. AP₂ trägt maßgeblich zur reduzierten Bildung der sekundären Botenstoffe IP₃ und DAG bei. IP₃ ist wiederum für die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} und damit für darauffolgende Signaltransduktionswege der Wirtszelle von Bedeutung. Der kontrollierte Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} spielt auch für die Aktivierung der NADPH-Oxidase sowie die Translokation bzw. Fusion von Granula mit dem bakteriellen Phagosom eine Rolle (Zhong *et al.*, 2003). Bisher ist unklar, welche genregulatorischen Wechselwirkungen zwischen PMNs und virulenten *L. pneumophila* stattfinden und welche Relevanz die Ausbildung des inaktivierten Phänotyps für die Ausbreitung der

Legionella-Infektion *in vivo* spielt. Da PMNs nach der Aufnahme von virulenten Legionellen „degenerieren“ und hierdurch ein Teil der Legionellen überlebt, war es von Interesse den Aspekt der Genregulation von infizierten PMNs mittels qRT-PCR näher zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür zunächst die Infektionsbedingungen für *L. pneumophila* Corby sowie ein Protokoll zur RNA-Isolation erfolgreich optimiert.

Etablierung der Infektionsbedingungen

Zur Durchführung der qRT-PCR-Studien wurde die Infektion in 24-Wellsschalen an die Bedingungen in 50 mL-Röhrchen angepasst. Dies ermöglichte die Infektion größerer Zellzahlen und damit höherer RNA-Ausbeuten pro Infektionsansatz. Außerdem wurden die Opsonisierungsbedingungen und die optimale MOI für die Infektion mit *L. pneumophila* Corby bestimmt. Wie bereits erwähnt, war eine Opsonisierung mit 1 % Lp-AK essentiell für die Aufnahme in PMNs. Die Zugabe von 25 % huS konnte die benötigte AK-Konzentration von 1 % auf 0,5 % senken, jedoch nicht vollständig ersetzen. In den meisten Fällen findet die Opsonisierung von Bakterien über den alternativen Komplementweg statt. *L. pneumophila* aktiviert hingegen ausschließlich den C3-vermittelten klassischen Komplementweg. Die Bakterien werden durch den Komplementfaktor C3b erkannt und über den Rezeptor CR3 an die PMNs gebunden. Die Phagozytose erfolgt jedoch erst durch die Bindung von Antikörpern an Fc-Rezeptoren Wirtszelle (Verbrugh *et al.*, 1985). Dies erklärt, warum die Zugabe von Komplement die Phagozytoserate von *L. pneumophila* Sg1 bei einer geringeren AK-Konzentration erhöht. Neben den standardisierten Opsonisierungsbedingungen spielen außerdem der Infektionszeitpunkt und die verwendete MOI eine entscheidende Rolle. Infektionsstudien dieser Arbeit zeigten, dass die Infektion mit MOI 10 zu einer nahezu 100%igen Infektionsrate führt. Allerdings wurde kurz nach erfolgter Phagozytose der Bakterien Apoptose in den Wirtszellen induziert. Ziel war es hingegen einen Einblick in die Mechanismen zu bekommen, die zur Ausbildung des inaktivierten Phänotyps führen. Als Kompromiss zur 100%igen Infektionsrate wurde MOI 5 mit einer 30%igen Infektionsrate gewählt. Abbildung 6.2 gibt einen Überblick über die Infektionsbedingungen von PMNs mit *L. pneumophila*.

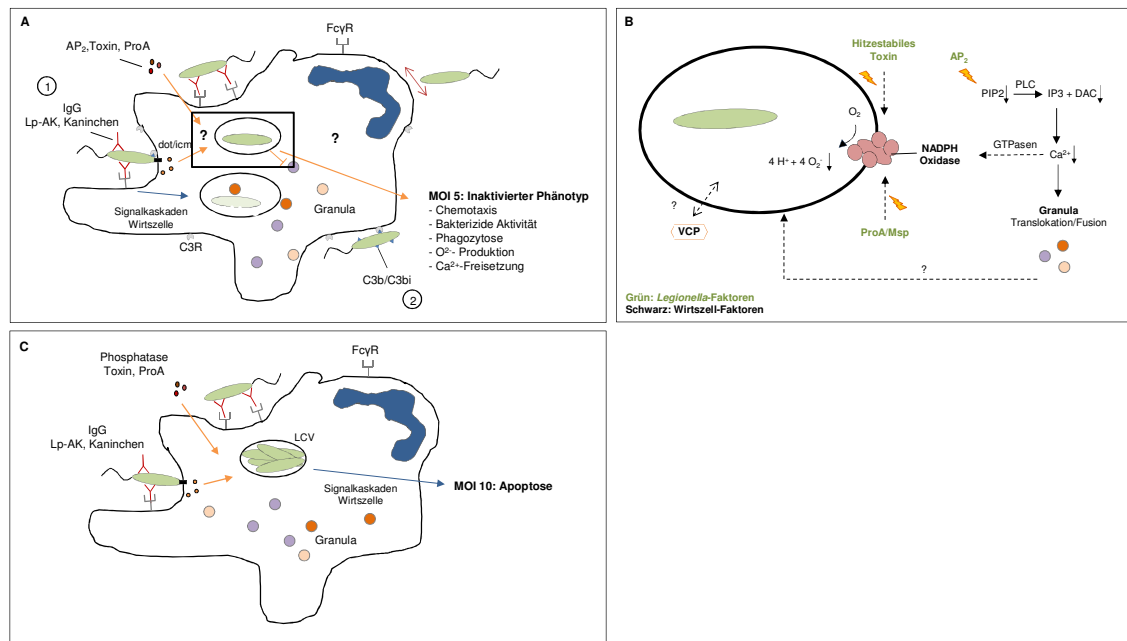


Abbildung 6.2: Infektion von PMNs mit *L. pneumophila*. PMNs nehmen nur mit Lp-AK opsonisierte Legionellen auf (1). Die Opsonisierung mit huS führt zu einer Bindung der Komplemente C3b und C3bi an das major outer membrane protein (MOMP), ohne jedoch Phagozytose zu induzieren (2). Nach erfolgter Aufnahme der Bakterien wird ein Großteil der Legionellen durch einen massiven oxidativen burst und die Fusion mit Granula degradiert. Ein Teil der Legionellen überlebt jedoch und wird nicht abgebaut. Gleichzeitig erfolgt die Inaktivierung von PMNs durch *Legionella* (A). In (B) sind Wechselwirkungen von PMNs mit Legionellen dargestellt, die an der Ausbildung des inaktivierten Phänotyps beteiligt sind. Hierzu zählen ein hitzestabiles Toxin, Msp/ProA und AP_2 . Es kommt zur Inhibition von Chemotaxis und einer reduzierten Phagozytoserate sowie bakteriziden Aktivität der Wirtszelle. Weiterhin sind die Produktion von O_2^- sowie Ca^{2+} nach Stimulation mit fMLP herabgesetzt. Bei sehr hohen Bakterienzahlen (MOI 10) wird kein inaktivierter Phänotyp hervorgerufen sondern direkt Apoptose ausgelöst (C).

qRT-PCR-Studien

Aufgrund des schnellen Abbaus von *L. pneumophila* Corby kurz nach der Aufnahme ist anzunehmen, dass Legionellen bereits früh (5-35 min nach Infektion) mit den PMNs interagieren, um einen vollständigen Abbau zu verhindern. Daher beschränkten sich die Versuche zunächst auf den Vergleich ausgewählter Zielgene für qRT-PCR-Studien zwischen nicht infizierten und mit *L. pneumophila* Corby infizierten PMNs zu den Zeitpunkten 5, 10 und 20 min. Die Auswahl der Gene für die Durchführung qRT-PCR erfolgte in Anlehnung an Proteomstudien der LCV in *D. discoideum* und unter der Annahme, dass Parallelen zur der Infektion in PMNs bestehen. Die Aufnahme und Vermehrung im Modellorganismus *D. discoideum* ähnelt in vielerlei Hinsicht der *Legionella*-Vermehrung in humanen Makrophagen. Deshalb hat sich *D. discoideum* als

Modellorganismus in der Aufklärung einer Vielzahl von Interaktionen zwischen Legionellen und Wirtszellen bewährt (Solomon & Isberg, 2000, Steinert, 2011).

HRPT1 und RPL32 wurden unter den gewählten Infektionsbedingungen stabil in PMNs exprimiert und mittels GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) als Referenzgene bestätigt. Im Anschluss wurden qRT-PCR-Analysen mit den Zielgenen *IL-1 β* , *gdi1*, *vcp*, *eef2* und *cdc42* durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass *IL-1 β* , *gdi1*, *eef2* und *cdc42* durch virulente *L. pneumophila* Corby im Zeitraum von 5-20 min nicht differenziell reguliert werden. Einzig *vcp* wurde 20 min nach Infektion verstärkt in den infizierten Zellen exprimiert. Proteomstudien mit *D. discoideum* zeigten bereits, dass die Level an VCP in der LCV nach einer Infektion mit *L. pneumophila* Corby im Vergleich zur Infektion mit avirulenten *L. hackeliae* stark erhöht sind (Shevchuck *et al.*, 2009). Einen weiteren Hinweis auf die Relevanz der AAA-ATPase VCP für die *Legionella*-Infektion lieferten siRNA-Studien mit humanen HEK-2- und *Drosophila*-Zellen. Verringerte VCP-Level inhibierten die Replikation von *L. pneumophila* (Dorer *et al.*, 2006). Die Arbeitsgruppe zeigte außerdem, dass polyubiquitinierte Proteine in Abhängigkeit vom Typ IVB SS kurz nach erfolgter Phagozytose von *L. pneumophila* an der LCV akkumulieren. Poly-ubiquitinierte Proteine stellen wiederum das Substrat für VCP und weitere Interaktionspartner dar (Dorer *et al.*, 2006). Als zytosolisches Chaperon ist die AAA-ATPase VCP an der Regulation zahlreicher zellulärer Ubiquitin-vermittelter Abbauprozesse beteiligt, die der Qualitätskontrolle der Zelle dienen. AAA-ATPasen können ubiquitinierte Substrate z.B. aus Proteinkomplexen oder Zellmembranen isolieren und dem Proteasom-vermittelten Abbau zuführen (Ju & Wehl, 2009, Meyer *et al.*, 2012). Es wird vermutet, dass VCP an der Translokation spezifischer *Legionella*-Effektoren von der LCV beteiligt ist und hierdurch eine entscheidende Rolle bei der Modulation der LCV und Etablierung der Infektion spielt (Dorer *et al.*, 2006). Aufgrund der Tatsache, dass Wiederholungen mit derselben Ausgangs-RNA zu stark voneinander abweichenden Expressionsleveln für *vcp* führten, muss die vorliegende Tendenz aus dieser Arbeit in weiteren Versuchen statistisch abgesichert werden (s. Abbildung 5.4 A und B). Die unterschiedlichen Ergebnisse für die Expressionslevel von *vcp* bei Verwendung derselben RNA sind nur schwer zu erklären. Die RNA-Integrität

betrug $\geq 8,5$. Damit kann ausgeschlossen werden, dass ein großer Teil der mRNA degradiert wurde. Die Schmelzkurven der qRT-PCR zeigten keine Doppelpeaks oder Verunreinigungen der Wasserkontrolle. Um einen systematischen Fehler auszuschließen, müssten die Versuche mindestens zweimal wiederholt werden. Dies war jedoch aus Zeitgründen nicht möglich. Weiterhin wurde mehrfach cDNA aus derselben RNA synthetisiert. Die Synthese erfolgte an verschiedenen Tagen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die RNA degradiert ist oder eine fehlerhafte Synthese der cDNA vorlag. Weiterhin ist es zwingend erforderlich, die Infektionsstudien mit PMNs von mindestens zwei weiteren Spendern durchzuführen.

Eine mögliche Erklärung für die ausbleibende differenzielle Regulation der übrigen Zielgene könnte darin bestehen, dass PMNs und *D. discoideum* unterschiedlicher auf die Infektion reagieren, als zuvor angenommen wurde. Trotz der ähnlichen Funktion in Bezug auf die Abwehr von Pathogenen, unterscheiden sich PMNs in einigen Punkten von Makrophagen und von *D. discoideum*. In letzteren findet die Phagozytose von Legionellen unabhängig von spezifischen Antikörpern statt. Der oxidative burst ist wesentlich schwächer ausgeprägt und Legionellen können sich sowohl in Makrophagen als auch in *D. discoideum* innerhalb der LCV vermehren. In PMNs findet hingegen ein starker Abbau in den ersten 60 min nach Infektion statt. Im Verlauf der Infektion erfolgt die Ausbildung eines inaktivierten Phänotyps. Die für eine *Legionella*-Infektion in Makrophagen und *Dictyostelium* relevante Anlagerung von ER und die Ausbildung einer replikativen Vakuole wurde bei PMNs nicht beobachtet (Gagnon *et al.*, 2002). Hieraus kann man schlussfolgern, dass *D. discoideum* eher ein Modellorganismus für Makrophagen und Monozyten darstellt. Eventuell sind eigenständige Proteom- bzw. Transkriptomstudien nötig, um die Rolle von PMNs für die Legionärskrankheit zu evaluieren. Durch diese Vorgehensweise könnte eine möglicherweise „falsche Auswahl“ von Zielgenen ausgeschlossen werden.

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Auswahl des betrachteten Zeitpunkts. Dies wurde u.a. in einer Microarray-Studie deutlich, in der PMNs mit *Y. pestis* infiziert wurden. Virulente Yersinien greifen über Effektoren des Typ III SS aktiv in die

Genexpression von PMNs ein und unterdrücken die Expression von Zytokinen, die der Immunabwehr dienen. Änderungen in Bezug auf die Expression verschiedener mRNAs fanden hauptsächlich im Zeitraum von 60-120 min statt. Nur wenige Gene wurden bereits 30-60 min nach Infektion differenziell reguliert (Subrahmanyam *et al.*, 2001). Möglicherweise erfolgt die Regulation der Zielgene in der Versuchsaufstellung der vorliegenden Arbeit ebenfalls zu einem späteren Zeitpunkt. Ein ähnliches Ergebnis wurde in der Studie von Tsukahara *et al.*, 2003 veröffentlicht. Hier wurden 385 Gene differentiell nach Inkubation mit 100 µg/mL LPS im Vergleich mit unbehandelten PMNs reguliert. Nach 30 min wurden im Vergleich zu späteren Zeitpunkten nur wenige, vor allem in Apoptose und Signaltransduktion involvierte Gene reguliert. Nach 120 min wurden deutlich mehr Gene differenziell reguliert. Diese waren an der Zell-Zell-Kommunikation, Signaltransduktion, Immunantwort, Apoptoseprozessen und Transkription beteiligt. DNA Microarray-Studien in denen die Genregulation von PMNs bei CR-, FcR oder CR/FcR-vermittelter Phagozytose von Latex beads analysiert wurde, zeigen ebenfalls eine verstärkte Induktion bzw. Repression von insgesamt 256 Genen nach 90 min. Nach 10 und 30 min wurde hingegen eine geringe Anzahl an Genen differenziell reguliert (Kobayashi *et al.*, 2002). In vorliegender Arbeit erfolgte die Aufnahme von *L. pneumophila* Corby ebenfalls FcR-vermittelt. Dies legt nahe, dass ähnliche Gene reguliert werden könnten. Da die verwendeten Zielgene jedoch nicht in der Studie von Kobayashi *et al.*, 2002 aufgeführt werden, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Um abzusichern, dass die qRT-PCR prinzipiell funktioniert, könnten als Positivkontrolle zunächst bekannte Targets wie TNF- α untersucht werden. Dieses Target wurde nach Rezeptor-vermittelter Phagozytose von IgG-markierten Latex beads in der Studie von Kobayashi *et al.*, 2002 hochreguliert. Um den tatsächlich durch virulente Legionellen hervorgerufenen Einfluss auf PMNs zu analysieren, muss in Folgeexperimenten der alleinige Einfluss von IgG im Vergleich zu Infektion mit virulenten und avirulenten untersucht werden.

Da PMNs nach Aufnahme von virulenten Legionellen „degenerieren“, wäre eine weitere interessante Fragestellung, wie infizierte PMNs durch das Immunsystem eliminiert werden. Die Interaktion zwischen PMNs und Makrophagen ist hierbei besonders interessant. So nutzen *Leishmania major*

und *Chlamydia pneumonia* PMNs als Trojanisches Pferd um in ihre spätere Wirtszelle, die Makrophagen zu gelangen. Ungefähr 2-4 Tage nach Infektion werden infizierte PMNs apoptotisch und von Makrophagen phagozytiert. Im Gegensatz zur Aufnahme von Pathogenen werden hierbei keine antibakteriellen Abwehrmechanismen eingeleitet. Über die somit „stille“ Aufnahme durch apoptotische PMNs sind die Bakterien schneller und besser in der Lage, ihre replikative Nische in den Makrophagen zu etablieren (Lasky *et al.*, 2007). Legionellen aus inaktivierten PMNs könnten ähnlichen Prozessen unterliegen.

6.1.2 Die Bedeutung von NETs für Infektionen *L. pneumophila*

PMNs können Pathogene nicht nur durch Phagozytose abbauen, sondern sie sind außerdem in der Lage die Ausbreitung von Pathogenen im Gewebe durch die Bildung von NETs zu verhindern (Brinkmann *et al.*, 2004). NET-Bildung wird durch bakterielle LPS, IL-8 und andere Signale stimuliert und unterscheidet sich von Apoptose und Nekrose (Fuchs *et al.*, 2007). Die NETs bestehen aus einem DNA-Grundgerüst, das antimikrobielle Peptide, Histone sowie Proteasen enthält und sie werden aktiv durch PMNs freigesetzt. Pathogene wie *E. coli*, *Burkholderia pseudomallei* oder *Candida albicans* stimulieren die Bildung von NETs, bleiben in den DNA-Protein-Strukturen hängen und werden zum Teil degradiert (Brinkmann *et al.*, 2004, Urban *et al.*, 2006, Grinberg *et al.*, 2008). Andere Bakterien, zu denen *S. aureus* und *S. pneumoniae* zählen, entgehen dem Abbau durch die Expression von DNasen oder die Modifikation ihrer Oberflächenstruktur (Buchmann *et al.* 2006, Berendts *et al.* 2010).

Versuche dieser Arbeit zeigten, dass *L. pneumophila* Corby weder in der Lage war NETs zu induzieren, noch wurden bereits vorhandene NETs durch *L. pneumophila* degradiert. Obwohl aus anderen Arbeiten hervorgeht, dass *L. pneumophila*-Stämme in der Lage sind DNasen sowie RNasen zu produzieren (Thorpe & Miller, 1981, Aragon *et al.*, 2000), konnte für *L. pneumophila* Corby in dieser Arbeit keine DNase-Aktivität nachgewiesen werden. Um sicher zu gehen, dass der verwendete Nuklease-Agar sensitiv genug gewesen ist, sollte das Ergebnis durch zusätzliche Versuche abgesichert werden. Eine Möglichkeit besteht in der Inkubation von Kulturüberständen mit einer definierten Konzentration nicht degradierter DNA und der Durchführung

einer Agarose-Gelelektrophorese. Degradierete DNA würde hier als Schmierbande sichtbar werden. Eine mögliche Ursache für die fehlende Induktion von NETs könnte durch die besondere LPS Struktur von Legionellen bedingt sein. Charakteristisch ist die hydrophobe O-Kette der LPS, die aus Legionaminsäure besteht. Darüber hinaus besteht das Lipid A aus ungewöhnlich langen, verzweigten Fettsäuren und unterscheidet sich dadurch erheblich von anderen Gram-negativen Bakterien (Shevchuck *et al.*, 2011). Der unterschiedliche Aufbau der LPS ist u.a. für eine stark verringerte Endotoxizität von Legionellen verantwortlich. Um dieselbe Zytokinproduktion in Makrophagen zu erhalten, mussten 1000-fach höhere Konzentrationen an *Legionella*-LPS im Vergleich zu LPS aus *Enterobacteriaceae* eingesetzt werden (Neumeister *et al.*, 1998). Die vorliegenden Versuche deuten darauf hin, dass die Induktion von NETs keine Rolle für die Abwehr von Legionellen zu spielt.

6.2 Die Rolle von PI-Metabolismus und Autophagie für die Infektion mit *Legionella*

L. pneumophila gehört zu den intrazellulären Pathogenen, die sich erfolgreich in Phagosomen von Amöben sowie in humanen Makrophagen vermehren können. Hauptvirulenzfaktor ist das Typ IV B SS, das den Bakterien ermöglicht eine replikative Nische in ihrer Wirtszelle zu etablieren und einer Fusion mit Lysosomen zu entgehen. Hierbei interagiert *L. pneumophila* effektiv mit Signaltransduktionswegen und dem Vesikeltransport der Wirtszelle. Viele der Virulenzfaktoren wurden bereits identifiziert, ihre Interaktionspartner auf der Wirtszellseite sind jedoch oft unbekannt. In dieser Arbeit wurden *Dictyostelium*-Deletionsmutanten verwendet, um die Relevanz einzelner Wirtsfaktoren im Bereich des PI-Metabolismus und der Autophagie für die Infektion mit *Legionella* zu charakterisieren.

6.2.1 Die Bedeutung von RpkA für die *Legionella*-Infektion

Phosphoinositide gehören zu den wichtigsten Signalmolekülen der Zelle und spielen u.a. bei Prozessen wie der Apoptose, der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, Phagozytose oder der Regulation des Zellzyklus eine Rolle. Sie

steuern Transportmechanismen von Membranen (Vesikeltransport) und bestimmen die Identität membranhaltiger Kompartimente. So ist PI3P hauptsächlich in der Membran von frühen Endosomen und Phagosomen lokalisiert, PI(4,5)P₂ an der Plasmamembran, PI4P am Golgi und PI(3,5)P₂ findet sich an späten Endosomen und Lysosomen wieder (Behnia & Munro, 2005, Pizarro-Cerda & Cossart, 2011). Die Synthese der einzelnen Phosphoinositide wird örtlich und zeitlich strikt durch das Zusammenspiel kleiner GTPasen, Phospholipasen, Kinasen, Phosphatasen und anderer Proteine reguliert. Hierbei dienen Phosphoinositide als Anker für weitere Proteine und katalysieren enzymatische Reaktionen oder wirken als sekundäre Botenstoffe um spezifische Kompartimente, wie z.B. Phagosomen zu bilden.

Intrazelluläre Pathogene, zu denen *Legionella*, *Listeria*, *Shigella* oder *Mycobacterium* zählen, interagieren effektiv mit dem PI-Metabolismus der Wirtszelle. Bakterielle Effektorproteine sind in der Lage Phosphoinositide zu maskieren, nachzuahmen, zu inhibieren oder zu aktivieren sowie Phosphoinositide zu binden und an bestimmte Zellkompartimente zu rekrutieren. Bakterien modulieren hierüber Prozesse wie die bakterielle Aufnahme, die Bildung replikativer Vakuolen oder Apoptose (Hilbi, 2006). Durch die Produktion der PI-Analoga Lipoarabinomannan (LAM) und Phosphatidylinositolmannosid (PIM) ist *M. tuberculosis* in der Lage, die Ansäuerung des Phagosoms zu inhibieren (Chua *et al.*, 2004, Pizarro-Cerda & Cossart, 2011). *L. pneumophila*-Effektoren interagieren ebenfalls mit dem PI-Metabolismus der Wirtszelle und tragen zur Modulation des Phagosoms in eine replikative Vakuole bei. Einige Effektorproteine wie SidC, SidM/DrrA, LpnE oder LidA binden über PI4P oder PI3P an die zytosolische Seite der LCV. Hierbei interagieren sie mit den kleinen GTPasen Arf1, Sar1 oder Rab1 sowie weiteren Wirtszellproteinen und manipulieren den Transport von Vesikeln und Organellen an die LCV. So wirken sich die dominant negative Form der GTPase Sar1 und Rab1 (Kagan & Roy, 2002) oder das Fehlen des Effektorproteins SidJ negativ auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella* aus (Liu & Luo, 2007).

RpkA ist ein sieben-Helix Transmembranprotein mit einer G-Protein gekoppelten Rezeptordomäne (GPCR) am Aminoterminal und einer C-terminalen Lipidkinasedomäne. Letztere wurde als eine PI4P5-Kinase vorhergesagt. In *D. discoideum* wird *rpkA* über den gesamten Lebenszyklus hinweg exprimiert und ist an endosomalen Membranen lokalisiert, zu denen Lysosomen, späte Endosomen und reifende Phagosomen zählen. Hierin unterscheidet sich RpkA deutlich von anderen PI4P5Ks, die sich hauptsächlich an der Plasmamembran befinden und an der Bildung des „phagocytic cup“ beteiligt sind (Riyahi *et al.*, 2011). In Studien mit *D. discoideum* wies die Deletionsmutante *rpkA*⁻ eine gestörte Fruchtkörperbildung sowie eine um 20% verminderte Phagozytoserate von Hefe auf. Die Aufnahme von *Legionella* wurde hingegen nicht beeinflusst. Eine Ursache dafür könnten die unterschiedlichen Aufnahmeprozesse sein. Hefe sowie *E. coli* werden hauptsächlich über Phagozytose aufgenommen, Legionellen hingegen über Makropinozytose unter Beteiligung von PI3Ks und PLC (Peracino *et al.*, 2010, Riyahi *et al.*, 2011, Balest *et al.*, 2011).

Weitere Versuche zeigten eine bessere Vermehrung von wildtypischen Legionellen zu späten Infektionszeitpunkten und einen verzögerten Abbau von weniger virulenten *L. hackeliae* sowie der Typ IVB SS-Mutante *dotA*⁻. Der schlechtere Abbau ist erstaunlich, da *Dictyostelium* avirulente Stämme normalerweise sehr effizient und schnell degradiert. Hierin weist *rpkA*⁻ Parallelen zu den weniger aggressiven Makropagen auf. In Makrophagen wird *dotA*⁻ nicht degradiert und *L. hackeliae* ist sogar in der Lage sich zu vermehren (Alli *et al.*, 2003). RpkA besitzt demnach eine entscheidende Bedeutung bei der Abwehr von weniger virulenten Legionellen. Die Effektoren des Typ IVB SS sind für Legionellen essentiell, um die Fusion mit Lysosomen zu verzögern und eine replikative Nische zu etablieren. Es ist allerdings auch bekannt, dass LPS oder OMVs allein in der Lage sind, die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen zu unterdrücken (Seeger *et al.*, 2001). Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass RpkA mit VatA an Phagosomen, sauren Endosomen und Lysosomen kolokalisiert. Außerdem wurde RpkA nach 10-minütiger Inkubation mit hitzeinaktivierten Legionellen sowie nach einstündiger Inkubation mit lebenden Legionellen an der LCV beobachtet. Nach Phagozytose von TRITC-markierten *S. cerevisiae* wurde RpkA mit ähnlichen Kinetiken wie die V-H⁺-ATPase an

Phagosomen angelagert. Dies lässt vermuten, dass RpkA eventuell bei der Rekrutierung oder Aktivierung der V-H⁺-ATPase zur LCV eine Rolle spielt. Die Deletion von *rpkA* könnte zu einer späteren Ansäuerung führen und dadurch die Aktivierung des Eisentransporters Nramp verhindern, dessen Aktivität über den Protonengradienten der V-H⁺-ATPase gesteuert wird. Liegt die V-H⁺-ATPase in inaktiver Form vor, kann Nramp kein Eisen aus der LCV pumpen. Eisen ist wiederum ein essentieller Wachstumsfaktor für *L. pneumophila*. Somit wirkt sich eine spätere Anlagerung der V-H⁺-ATPase oder deren Inaktivierung positiv auf die bakterielle Replikation aus (Peracino *et al.*, 2012). Dies zeigten Studien von Balest *et al.*, 2011, in denen die Mutation der Rho-GTPase RacH die Ansäuerung der LCV inhibierte und zu einer besseren Replikation von *L. pneumophila* führte. Es wird vermutet, dass RacH an der Rekrutierung saurer Vesikel entlang von Mikrotubuli zum Phagosom involviert ist. Eine detaillierte Analyse von *rpkA*⁻ mittels Lysotracker in Infektionen mit virulenten *L. pneumophila* bzw. den avirulenten Stämmen könnte zur Klärung obiger Vermutung beitragen. Dieser Vermutung steht jedoch das Ergebnis der pH-Wertbestimmung in der Deletionsmutante und AX2 nach dreistündiger Inkubation mit FITC-Dextran entgegen. Hier lag der pH-Wert in beiden Fällen bei 5,3 und lieferte keinen Hinweis auf eine verspätete Ansäuerung (Riyahi *et al.*, 2011). Dennoch sollte überprüft werden, ob die Infektion mit avirulenten Legionellen zum selben Ergebnis führt. Ein Modell zur möglichen Rolle von RpkA während der Infektion mit Legionellen zeigt Abbildung 6.3.

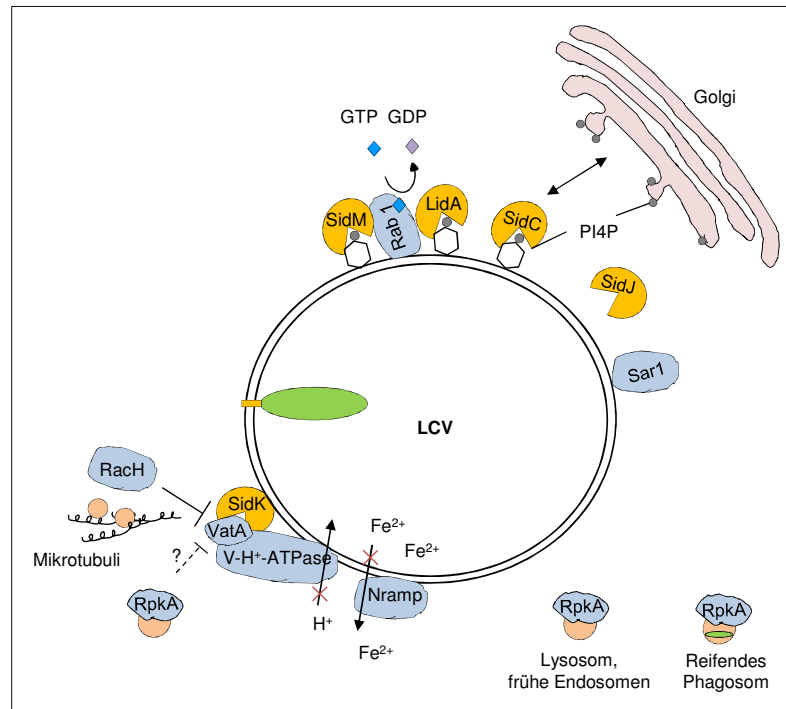


Abbildung 6.3: Mögliche Funktion von RpkA während der Infektion mit *Legionella* in *D. discoideum*. RpkA ist an endosomalen Membranen lokalisiert und wird spezifisch an Phagosomen rekrutiert. Dort interagiert das Protein mit VatA und VatM, zwei Untereinheiten der V-H⁺-ATPase. Es ist möglich, dass RpkA an der Rekrutierung der V-H⁺-ATPase an das Phagosom beteiligt ist. Die Depletion von RpkA könnte eine verzögerte Anlagerung der V-H⁺-ATPase (auch bei avirulenten Legionellen) zur Folge haben. Die V-H⁺-ATPase ist für die Ausbildung eines Protonengradienten an der phagosomalen Membran verantwortlich und für die Funktionalität des Eisentransporters Nramp. Ist dieser inaktiv, wird kein Eisen aus der Vakuole hinaus transportiert. Eisen wiederum ist für die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen essentiell. Dargestellt ist außerdem die Interaktion weiterer Wirtszellfaktoren (blau) mit *Legionella*-Effektorproteinen (orange) an der LCV. Die Anlagerung spezifischer PIs an Membranen bedingt die Organellen-spezifische Rekrutierung von Proteinen und reguliert den Vesikeltransport. Einige *Legionella*-Effektoren wie SidM, SidC und LidA binden PI4P bzw. PI3P, interagieren mit verschiedenen kleinen Wirtszell-GTPasen (Rab1, Sar1, RacH) und tragen hierüber zur Modulation der LCV bei. Die Deletion von *rpkA* führt zu stark veränderten PI-Leveln. Eventuell beeinflusst dies eine verlangsamte Rekrutierung von Lysosomen an die LCV und bedingt dadurch einen verlangsamten Abbau avirulenter Legionellen.

Charakteristisch für die Deletionsmutante *rpkA*⁻ ist außerdem der veränderte PI-Haushalt. *RpkA*⁻ weist ca. 70 % geringere Level an PIP (PI3P, PI4P und / oder PI5P) und um 44 % verringerte PIP2-Level (PI(3,4)P2, PI(3,5)P2 und / oder PI(4,5)P2) auf. Aufgrund der vorhergesagten PI4P5K-Aktivität entsprach dies nicht dem erwarteten alleinigen Anstieg des Substrates PI4P und der Abnahme des Produktes PI(4,5)P2. RpkA könnte demnach auch direkt in die Synthese von PIP involviert zu sein (Riyahi *et al.*, 2011). Abbildung 6.4 zeigt schematisch den Einfluss der RpkA-Deletion auf den PI-Haushalt in *D. discoideum*.

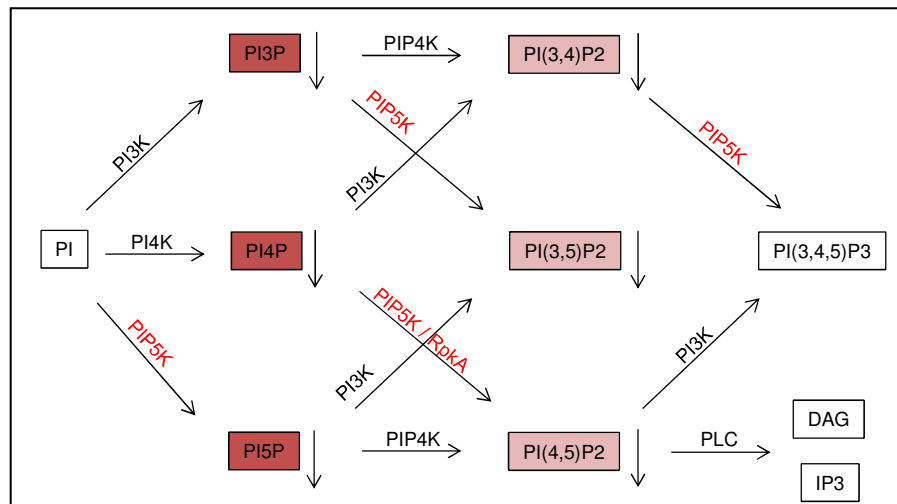


Abbildung 6.4: Schema zum Einfluss der *rpka*-Deletion auf den PI-Haushalt in *D. discoideum*. RpkA wurde als eine PI4P5-Kinase vorhergesagt. Die Deletionsmutante *rpka*⁻ besitzt reduzierte Level an PI-monophosphaten PI3P, PI4P, PI5P (dunkelrot) und den PI-diphosphaten PI(3,4)P2, PI(3,5)P2 und PI(4,5)P2 (hellrot).

Phosphoinositide besitzen eine Schlüsselfunktion in der Regulation diverser zellulärer Prozesse wie der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion, Aktin-Zytoskelett-Modulation oder dem Membran-Trafficking. Die Anlagerung von PI3P an die LCV, einem Marker für frühe Endosomen, ist z.B. essentiell für die phagosomale Reifung (Gillooly *et al.*, 2001, DeMatteis & Godi, 2004). Der *Legionella*-Effektor LpnE bindet PI3P und verhindert dadurch dessen Anlagerung an die LCV. Wie wichtig PI3P für die normale Reifung der Phagosomen ist, zeigt außerdem eine Inhibition von PI3Ks durch Wortmannin. In Anwesenheit des PI3K-Inhibitors Wortmannin wird weniger PI3P synthetisiert und an die LCV angelagert. Dies verringert zwar die Aufnahme von avirulenten Legionellen, resultiert jedoch auch in einem verlangsamten Abbau der Bakterien. Die Aufnahme von Legionellen mit intaktem Typ IVB SS wird hingegen nicht beeinflusst (Weber *et al.*, 2006, 2009b). Es ist durchaus möglich, dass die stark veränderten PIP- und PIP2-Level in *rpka*⁻ zum verlangsamten Abbau avirulenter Legionellen beitragen. In Versuchen unter Stickstoffmangel wies *rpka*⁻ außerdem eine verringerte Toleranz im Vergleich zu AX2 auf. Möglicherweise ist RpkA auch an autophagosomalen Abbauprozessen beteiligt (Riyahi *et al.*, 2011). Intensive Fluoreszenzstudien und Lebendzellaufnahmen könnten klären, ob die Anlagerung lysosomaler Marker wie Mannose-6-Phosphat oder LAMP-1 oder des Autophagosomen-Markers Atg8 verzögert

sind und die Phagolysosomenfusion bei *L. hackeliae* und *dotA*⁻ verspätet stattfindet.

6.2.2 Die Bedeutung von Atg9 für die *Legionella*-Infektion

Autophagie ist ein hoch konservierter zellulärer Prozess, der u.a. dafür sorgt den Nährstoffmangel der Zelle zu überbrücken und Proteinaggregate sowie falsch gefaltete Proteine abzubauen (Noda *et al.*, 2009, He & Klionsky, 2009, Morceau *et al.*, 2010). Außerdem wird Autophagie mit systemischen Krankheiten, wie der IBMPFD beim Menschen, Alterungsprozessen und der Zellentwicklung in Zusammenhang gebracht (Calvo-Carrido *et al.*, 2010). Bisher wurden 35 Atg-Proteine in der Hefe identifiziert, die an der Bildung des Autophagosoms beteiligt sind (Mizushima *et al.*, 2011). Autophagie ist ein zellulärer Prozess, bei der ganze Zellorganellen von einer *de novo* im Zytoplasma gebildeten Lipiddoppelmembran umschlossen und über die Fusion mit Lysosomen im sogenannten Autophagolysosom degradiert werden. Bisher ist nicht geklärt, woher die Membran für die *de novo* Synthese der autophagosomalen Membran stammt. Studien deuten darauf hin, dass sowohl Membranen des ER, der Mitochondrien und die Plasmamembran an der Bildung der Autophagosomen beteiligt sind (Rubinstein *et al.*, 2012). Eine Kernfunktion in der Bildung der Autophagosomen wird dem Transmembranprotein Atg9 zugeschrieben. Es wird vermutet, dass es u.a. an dem Transport von Lipiden an die wachsende Isolationsmembran (Phagophore) beteiligt ist. Für *S. cerevisiae* zeigten Yamamoto *et al.*, dass Atg9-haltige Vesikel am Golgi Apparat unter Beteiligung von Atg27 und Atg23 gebildet und in die Isolationsmembran integriert werden. Nach Vervollständigung des Autophagosoms wird Atg9 durch Abschnürung kleiner Membranvesikel recycelt. Autophagolysosomen enthalten somit kein Atg9 mehr (Yamamoto *et al.*, 2012). In *Dictyostelium* befindet sich Atg9 in kleinen Vesikeln, die an der Zellperipherie entstehen und entlang von Mikrotubuli zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum wandern (Calvo-Carrido *et al.*, 2010). In der Initiationsphase wird unter dem Einfluss des Atg1-Komplexes mit dem PI3K-Komplex die Phagophore gebildet. Gleichzeitig wird das Transmembranprotein Atg9 durch Zusammenwirken mit Atg17, Atg1, Atg23 und Atg27 an die Phagophore

rekrutiert. Für die Elongation der Phagophore sind zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme E1 und E2 verantwortlich. Hierbei werden PE-konjugiertes Atg8 sowie ein Komplex aus Atg16-Atg5-Atg12 gebildet und an die Membran angelagert. Atg9 ist zu diesem Zeitpunkt nicht mehr auf der Membran vorhanden (Xie *et al.*, 2008, Webber & Tooze, 2010, Munakata & Klionsky, 2010). Nach Schließung zum Autophagosom erfolgt die Fusion mit Lysosomen und der Inhalt wird durch die lytischen Enzyme degradiert (s. Abbildung 2.5).

In den letzten Jahren wird Autophagie zunehmend als Komponente des angeborenen Immunsystems diskutiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung und dem Abbau von intrazellulären Pathogenen, wie z.B. Gruppe A Streptokokken, die dem endozytischen Abbau entkommen sind (Nakagawa *et al.*, 2004, Virgin & Levine, 2009). Welche Rolle die Autophagie während einer *Legionella*-Infektion spielt wird kontrovers diskutiert. Otto *et al.* untersuchten *D. discoideum*-Mutanten, bei denen jeweils eine Mutation in Atg1, Atg5, Atg6, Atg7 bzw. Atg8 vorlag und konnten keinen Einfluss auf die Infektion mit *L. pneumophila* feststellen (Otto *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu zeigten Transkriptomstudien eine deutliche Überexpression von *atg9* und eine Repression von *atg8* und *atg16* nach 24-stündiger Infektion von *D. discoideum* mit *L. pneumophila* Corby (Farbrother *et al.*, 2006). Die Deletion von *atg9* führte außerdem zu einer um 85 % reduzierten Aufnahme der Bakterien, einem verzögerten Abbau innerhalb der ersten 28 h nach Infektion und schließlich zu einer stärkeren Replikation (Tung *et al.*, 2010). Die Autoren vermuteten, dass Autophagie eine protektive Wirkung für den Wirtsorganismus *D. discoideum* besitzt. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die beiden *atg9*-Komplementanten AAG1 und AGA5 untersucht, in denen *atg9* als GFP-Fusionsprotein 10-fach überexprimiert wurde.

Die phänotypischen Eigenschaften der Stämme AX2, *atg9*, AAG1 und AGA5 entsprachen trotz veränderter Anzuchtbedingungen bei 25 °C an Stelle von 23 °C den von Tung *et al.* beschriebenen Beobachtungen. Die Komplementanten AAG1 und AGA5 zeigten ein wildtypisches Vermehrungsverhalten in Flüssigkultur und waren in der Lage Fruchtkörper unter Nährstoffmangel auszubilden. Entgegengesetzt der Annahme, dass die Komplementation das Aufnahmedefizit der *atg9*-Mutante (43 %) ausgleicht, lag

die Aufnahme mit ca. 19 % sogar noch niedriger als bei der Deletionsmutante. Interessant war hierbei, dass die geringe Aufnahmerate nur bei einer niedrigen MOI von 0,5 zum Tragen kam. Wurde die MOI auf 5 erhöht, verschwand dieser Effekt sowohl bei den Komplementanten als auch bei *atg9*⁻. In den folgenden 24 h nahm die Bakterienzahl in allen vier Stämmen ab. Zum Zeitpunkt 48 h nach Infektion setzte bei *atg9*⁻ und AX2 die Vermehrung ein und resultierte in einen 8- bis 12-fachen Anstieg der Bakterienzahl nach 72 h. In den Komplementanten konnten die Legionellen ihre Zellzahl 72 h nach Infektion lediglich verdoppeln. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Autophagie einen protektiven Effekt auf die *Legionella*-Infektion in *D. discoideum* besitzt und bestätigen somit die zuvor aufgestellte Hypothese von Tung *et al.*, 2010.

Dennoch existieren Unterschiede zwischen dem Infektionsverlauf in *atg9*⁻ in dieser Arbeit zu der Studie von Tung *et al.*, 2010. So konnte das Aufnahmedefizit von 85 % und die schnellere Vermehrung gegenüber AX2 nicht reproduziert werden. Möglicherweise besitzt die Kultivierung bei 25 °C (diese Arbeit) an Stelle von 23 °C (Tung *et al.*, 2010) doch einen Einfluss auf die Dictyostelien und wirkt sich auch auf die Infektionen mit *L. pneumophila* aus. Außerdem wurden die Infektionen in dieser Arbeit in kleinen Zellkulturflaschen mit MOI 0,02 durchgeführt, um das Aufnahmedefizit der verwendeten Stämme auszugleichen. Hierdurch war es möglich die großen Standardabweichungen nach 48 und 72 h, die bei Versuchen in 24-Wellschalen auftraten, zu minimieren. In der zugrundeliegenden Studie von Tung *et al.*, wurden die Versuche in 24-Wellschalen durchgeführt und das Aufnahmedefizit von *atg9*⁻ durch Erhöhung der MOI von 1 auf 8 angeglichen. Eine andere Erklärung für die abweichenden Ergebnisse in Bezug auf die *Legionella*-Infektion in *atg9*⁻ ist die spontane Mutation eines der beiden Stämme.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass trotz des beobachteten Aufnahmedefizits der Komplementanten AAG1 und AGA5 eine vollständige Reversion des Phänotyps von *atg9*⁻ in Bezug auf Wachstum und die Sporenbildung erfolgt. Tung *et al.* zeigten außerdem, dass die Phagozytose von *E. coli* ebenfalls wildtypisch verläuft, wohingegen *atg9*⁻ eine verminderte Phagozytose von *E. coli* aufweist (Tung *et al.*, 2010). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Komplementanten sowohl Makropinozytose zur

Aufnahme von Nährstoffen aus Flüssigkultur als auch Phagozytose zur Aufnahme von *E. coli* nutzen. Da Legionellen hauptsächlich über Makropinozytose aufgenommen werden, ist die verringerte Aufnahme von *L. pneumophila* in die Komplementanten schwer zu erklären. Möglicherweise führt die Überexpression von *atg9* zu einer schnellen Phagozytose gleichzeitig zu einem effektiveren Abbau der Bakterien als in AX2. Dies könnte die verringerte Bakterienzahl zum Zeitpunkt 3 h nach Infektion in den Komplementanten erklären. Autophagie ist ein hoch konservierter Prozess unter Eukaryoten und unterliegt einer ebenso strikten Regulation. Die Überexpression eines Interaktionspartners könnte dazu führen, dass das Gleichgewicht verschoben wird und sich unterschiedlich stark auf Entwicklung, Nährstoffversorgung oder Makropinozytose auswirkt. Lebendzellaufnahmen am Fluoreszenzmikroskop mit einfach exprimiertem Atg9-GFP im Vergleich zu den Komplementanten könnten Aufschluss über die Beteiligung von Atg9 an der Aufnahme von *L. pneumophila* geben. Ein weiteres Indiz für eine Beteiligung von Atg9 an der Bildung oder Reifung der LCV ist die Tatsache, dass sowohl Atg9 als auch die LCV entlang von Mikrotubuli transportiert werden. Es ist bekannt, dass virulente Legionellen die Anlagerung von Mitochondrien an die LCV bewirken. Atg9 könnte hierbei ein Bindeglied darstellen (Lu & Clarke, 2005, Calvo-Carrido *et al.*, 2010) und wirft die Frage auf, inwieweit Atg9 an der Rekrutierung von Mitochondrien zur LCV involviert ist.

Insgesamt konnte durch die Überexpression von Atg9 bestätigt werden, dass Autophagie relevant für die Bekämpfung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen in *D. discoideum* ist. Dass eine robuste Induktion von Autophagie zum Abbau der Bakterien führt, ist auch aus Studien mit *Legionella*-resistenten C57B/6-Mausmakrophagen bekannt (Amer *et al.*, 2005, Dubuisson & Swanson, 2006). In permissiven A/J-Mausmakrophagen ist *L. pneumophila* hingegen in der Lage eine Infektion zu etablieren. Studien deuten darauf hin, dass *L. pneumophila* gezielt zu Beginn der Infektion Autophagie induziert und im Anschluss mit Hilfe von Effektoren des Typ IVB SS die autophagosomale Reifung verlangsamt. Es gibt Hinweise darauf, dass Legionellen die NF- κ B-Signalkaskade aktivieren, dadurch anti-apoptotische Prozesse induzieren und ein frühzeitiges Absterben der Wirtszelle verhindern (Losnick & Isberg, 2006, Abu-Zant *et al.*, 2007). Nur

bei virulenten Legionellen wurden die Autophagiemarker Atg8/LC3 auf der LCV detektiert, nicht jedoch bei *dotA*-Mutanten. Weiterhin konnte die bakterielle Replikation durch Einsatz des Autophagie-Inhibitors 3-Methyladenin reduziert werden (Amer *et al.*, 2005, Dubuisson & Swanson, 2006). Dies zeigt eindrucksvoll, dass virulente Legionellen die Autophagie in permissiven Wirtszellen zu ihrem Vorteil nutzen, eine starke Autophagieinduktion zu Beginn der Infektion hingegen protektiv für Wirtszellen wie Makrophagen und *D. discoideum* ist.

6.2.3 Die Funktion der Punktmutation R155C in *at9/cdcD* während der *Legionella*-Infektion

Zusätzlich zum Transmembranprotein Atg9 wurde ein weiterer Wirtsfaktor, die AAA-ATPase CdcD untersucht. Sie ist wie die Autophagie ebenfalls an zahlreichen qualitätssichernden Prozessen wie dem Ubiquitin-vermittelten Abbau von Proteinaggregaten (UPS), der ER assoziierten Degradation (ERAD) sowie DNA-Reparaturprozessen beteiligt. So verursachen Mutationen beim Menschen häufig schwere systemische Krankheiten wie z.B. Morbus Padgett oder Frontotemporale Demenz. Erst kürzlich wurde der Abbau ubiquitiniert Proteine durch den Nachweis von Autophagosomenmarkern (Atg8/LC3) mit autophagosomalen Abbauprozessen in Verbindung gebracht. Es wird angenommen, dass CdcD als Ubiquitin-abhängiges Chaperon eine Schlüsselfunktion in der Koordination zwischen dem autophagosomalen und dem Ubiquitin-vermittelten Abbau darstellt (Ju & Wehl, 2009). Generell sind AAA-ATPasen über das Zusammenspiel mit weiteren Co-Faktoren dazu in der Lage, ubiquitinierte Substrate aus Zellmembranen zu isolieren und dem autophagosomalen Abbau zuzuführen. Krick *et al.* zeigten am Beispiel von Hefe, dass in Abwesenheit des Co-Faktors Ship1 keine Fusion des Autophagosoms mit Lysosomen stattfindet. Die Autoren vermuten, dass die AAA-ATPase an der Segregation des Membrangebundenen Atg8/LC3 beteiligt ist und erst nach dessen Ablösung die Fusion mit Lysosomen eingeleitet wird (Krick *et al.*, 2010). Das Zusammenspiel von CdcD, den Co-Faktoren und Autophagie ist noch lange nicht entschlüsselt. Die steuernde Funktion der AAA-ATPase macht sie auch in Hinblick auf Infektionsabläufe mit intrazellulären

Pathogenen wie z.B. *Legionella* interessant. Erste Hinweise auf eine Bedeutung von CdcD für den Infektionsverlauf von *Legionella* lieferte eine Studie mit humanen HEK293-Zellen und *Drosophila*-Zellen. Diese zeigte, dass die Inhibition von CdcD zu einer schlechteren Vermehrung der Legionellen führte. Außerdem erfolgte die *dot/icm*-abhängige Rekrutierung von CdcD an die LCV sowie die CdcD-abhängige Translokation der *Legionella*-Effektoren SidC und LidA ins Zytosol (Dorer *et al.*, 2006). Die Autoren spekulierten, dass die CdcD eventuell als Chaperon fungieren könnte und *dot/icm*-Effektoren in das Zytosol transloziert. Eine weitere Möglichkeit stellt die direkte Beteiligung von CdcD an der Degradation von Effektormolekülen dar, die die Reifung der LCV steuern. Um die Auswirkung von CdcD auf die Infektion von *Legionella* zu analysieren, wurde in dieser Arbeit die Doppelmutante *atg9⁻/cdcD⁻* untersucht. Hierbei wurde eine zusätzliche Punktmutation an Position R155C in der Deletionsmutante *Atg9⁻* eingefügt. Mutationen an Position R155C stellen den größten Anteil der beim Menschen auftretenden Mutationen im Fall von Multisystematropie dar (Watts *et al.* 2004). *Atg9⁻/cdcD⁻* besaß wie *atg9⁻* und andere Autophagiemutanten ein stark verlangsamtes Wachstum in Flüssigkultur und war nicht in der Lage Sporen zu bilden (Otto *et al.*, 2003, 2004a, Tung *et al.*, 2010). Nach 122 h erreichte die Doppelmutante nur die Hälfte der Zellzahl von *atg9⁻*. Dies liegt sehr wahrscheinlich daran, dass nun sowohl Autophagie als auch der Ubiquitin-vermittelte Abbau inhibiert werden und die Zelle wesentlich schneller Proteinaggregate anreichert. Diese stören mit der Zeit die Zellfunktion und führen letztendlich zur Degeneration der Zelle.

In Bezug auf den Infektionsverlauf mit *L. pneumophila* Corby konnten keine Unterschiede zwischen *atg9⁻* und *atg9⁻/cdcD⁻*-Doppelmutante beobachtet werden. Lediglich die Aufnahme lag mit 40-50 % leicht über der von *atg9⁻*.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Punktmutation R155C im Gen *cdcD* für die *Legionella*-Infektion keine Rolle spielt. Sie scheint lediglich einen Einfluss auf die Ubiquitin-assoziierte Autophagie zu haben. Proteomstudien und siRNA-Versuche deuten jedoch darauf hin, dass CdcD durchaus relevant für die erfolgreiche Etablierung der LCV ist (Shevchuck *et al.*, 2009, Dorer *et al.*, 2006). Da in der untersuchten Doppelmutante lediglich eine Punktmutation in *cdcD* eingefügt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die vollständige

Deletion einen anderen Effekt zeigt. Dies müsste in weiterführenden Versuchen geklärt werden.

6.3 Peptidlactone aus *B. pumilus* wirken bakterizid auf *Legionella* spp.

Bakterien der Gattung *Bacillus* kommen ubiquitär in feuchten Habitaten, der Luft sowie dem Boden vor und sind bekannt für die Synthese einer Vielzahl biologisch aktiver Substanzen. Aufgrund ihrer fungiziden, insektiziden, antibakteriellen, antiviralen und antitumor Eigenschaften sind sie sowohl für die biologische Schädlingsbekämpfung als auch für den medizinischen Bereich von Interesse (Munimbazi & Bullerman, 1998, Naruse *et al.*, 1989, Pereira de Melo *et al.* 2009). Ongena und Jacques zeigten außerdem, dass neben der direkten antimikrobiellen Wirkung auch ein immunstimulierender Effekt von Lipopeptiden auf Pflanzen ausgeht und eine erhöhte Resistenz gegenüber Phytopathogenen auslöst (Kloepper *et al.*, 2004, Ongena & Jaques, 2007).

Peptide bilden den größten Anteil der antimikrobiell wirksamen Sekundärmetabolite aus *Bacillus*. Ihre Synthese findet entweder über nicht-ribosomale Multienzymkomplexe (nicht-ribosomalen Peptid Synthetasen; NRPSs) oder durch die ribosomale Synthese von linearen Vorläuferpeptiden statt, die post-translational modifiziert und proteolytisch prozessiert werden (Stein, 2005). Lipopeptide bestehen aus einem kurzen, linearen oder zyklischen Peptid, welches an eine Fettsäure gebunden ist. Häufig liegen die Aminosäuren in D-Konfiguration vor, oder die Peptide enthalten seltene Aminosäuren wie Ornithin, wodurch das Peptid vor unerwünschtem Abbau durch Proteasen geschützt wird. Anhand von strukturellen Unterschieden in ihrer Aminosäuresequenz, der Zyklisierung sowie der Länge und Verzweigung der Fettsäurekette werden Lipopeptide in die Familie der Iturine, Fengycine und Surfactine eingeteilt. Mitglieder der Iturin- und Fengycin-Familie besitzen hauptsächlich fungizide Eigenschaften. Die biologische Aktivität von Surfactin-Derivaten umfasst hingegen ein breiteres Wirkungsspektrum. Aufgrund ihrer amphiphilen Struktur wirken Lipopeptide häufig als Tensid und besitzen emulsifizierende sowie schäumende Eigenschaften. Sie werden u.a. in der

Waschmittelindustrie, als Emulgatoren in kosmetischen Produkten oder zur verbesserten Ölgewinnung eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde der Bakterienstamm *B. pumilus* DKS1 isoliert. Das inhibitorische Spektrum war sehr spezifisch und beschränkte sich von insgesamt 30 getesteten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienstämmen auf 13 *Legionella* spp. und *S. pneumoniae*. Weiterhin wurde der phytopathogene Pilz *M. violaceum* inhibiert. Eine Sonderstellung nahm *R. solani* ein, bei dem in Kokulturen das Hyphenwachstum verlangsamt wurde, der Rohextrakt (400 µg pro Testplättchen) jedoch keinerlei Aktivität besaß. Möglicherweise wurde die hemmende Substanz nur in Kokultur mit dem Pilz synthetisiert oder es wurden zu geringe Extraktkonzentrationen eingesetzt. Es ist bekannt, dass *B. pumilus*-Stämme eine Reihe unterschiedlicher Verbindungen mit antiviraler, antibakterieller und antitumor Aktivität synthetisieren, wobei das Aktivitätsspektrum sehr spezifisch für den jeweiligen Stamm ist. (Munimbazi & Bullerman, 1998, Naruse *et al.*, 1989, Ramm *et al.*, 2003). In Bezug auf die Hemmung von phytopathogenen Pilzen wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass der Rohextrakt aus *B. pumilus* MAIIM4a das Hyphenwachstum von *R. solani*, *Pythium aphanidermatum* und *Sclerotium rolfsii* inhibiert (Pereira de Melo *et al.* 2009). Die Stämme *B. pumilus* B6 und B10 besaßen hingegen keinerlei bzw. lediglich eine schwache fungizide Wirkung auf *Aspergillus ochraceus* (Ouoga *et al.*, 2006). Aufgrund der Tatsache, dass von insgesamt 30 getesteten Bakterien-Stämmen lediglich 13 *Legionella*-Spezies sowie *S. pneumoniae* inhibiert wurden, lag der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Isolation und Aufklärung des sehr spezifischen, antibakteriellen Inhibitors. Aus der Literatur geht hervor, dass *B. pumilus* A586 u.a. eine antibakterielle Wirkung auf *S. aureus*, *Clavibacter michiganensis* und *Proteus vulgaris* besitzt (Pabel *et al.* 2003) und Legionellen durch *B. pumilus* B2, B3 und B5, *B. brevis* sowie *B. cereus* inhibiert werden. Dafür verantwortliche Inhibitoren wurden jedoch bisher nicht isoliert (Temmermann *et al.*, 2007, Erdem & Yazici, 2008).

In dieser Arbeit wurden Pumilacidin A, C, E sowie das neue Peptidlacton WF mit der Aminosäuresequenz Val-Leu-**Leu-Asp**-Leu-Leu-Glu aus *B. pumilus*

DKS1-Rohextrakt isoliert. Pumilacidine gehören zur Surfactin-Familie und bestehen aus einem zyklischen Heptapeptid (L-Glu-L-Leu-**D-Leu**-L-Leu-L-Asp-**D-Leu**-L-(Val/Ile)), dass mit einer β -hydroxy-Fettsäure (C12-C14) verbunden ist (Naruse *et al.*, 1990). In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Pumilacidine ebenfalls antibakterielle Eigenschaften gegenüber Legionellen sowie Streptokokken aufweisen. Bisher waren Pumilacidin A und B nur für ihre antivirale Wirkung auf das bekapselte Herpes simplex Virus, die Inhibierung von Ulceration sowie der gastrischen H^+ , K^+ -ATPase bekannt (Naruse *et al.*, 1990). Die antibakterielle Wirkung (MHK-Bestimmung) gegenüber *L. pneumophila* Corby und *L. hackeliae* nahm allgemein mit steigender Kettenlänge der Fettsäure zu (Peptidlacton WF, Pumilacidin B/“Patnam“ \rightarrow E, A \rightarrow C). Die Peptidsequenz scheint jedoch ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivität zu besitzen. Pumilacidin A, das Peptidlacton WF und Pumilacidin B/“Patnam“ enthalten einen C12-Fettsäurerest. Dennoch zeigte Pumilacidin A eine zweifach höhere Aktivität gegenüber den anderen beiden Peptidlactonen. Der Unterschied beruht auf der Aminosäure-Substitution Ile/Val an Position sieben bzw. der Substitution von Leu-Asp/Asp-Leu an Positionen vier und fünf (s. Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1: Hemmung von *L. pneumophila* durch Peptidlactone aus *B. pumilus*.

Name	Aminosäuresequenz	FS-Rest	MHK [µg/mL]	MHK [µM]
Pumilacidin C M=1077	Glu-Leu-Leu-Leu-Asp-Leu-Ile	C14	1,56	2
Pumilacidin E M=1063	Glu-Leu-Leu-Leu-Asp-Leu-Ile	C13	3,125	3
Pumilacidin A M=1049	Glu-Leu-Leu-Leu-Asp-Leu-Ile	C12	3,125	3
Peptidlacton WF M=1035	Glu-Leu-Leu-Asp-Leu-Leu-Val	C12	6,25	6
Pumilacidin B/“Patnam” M=1035	Glu-Leu-Leu-Leu-Asp-Leu-Val	C12	6,25	6

Die Bedeutung der Peptidzusammensetzung sowie der Länge des Fettsäurerestes ist auch aus Studien für das zyklische Lipopeptid Surfactin bekannt. Je länger der Fettsäurerest, desto besser findet die Insertion des amphiphilen Moleküls in die Membran statt. Außerdem wurde beschrieben, dass der Austausch von L-Val durch L-Ile an Position vier der Peptidsequenz zu einer stark verringerten kritischen Mizellbildungskonzentration führt und dadurch die Aktivität des Surfactins verringert (Seydlová *et al.*, 2011).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Surfactin und Pumilacidin ist es möglich, dass eine ähnliche Wirkungsweise vorliegt. Surfactin interagiert über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Lipidmembran, lagert sich in die Membran ein und führt zur deren Destabilisierung. Bei Einsatz geringer Konzentrationen wird angenommen, dass Poren in der Membran gebildet werden und hierdurch Ionen aus der Zelle entweichen. Bei Verwendung hoher Surfactin-Konzentrationen überwiegt der Detergenzien-Effekt und die Membran wird zerstört. Die Dimerisierung von Surfactinmolekülen in der Membran führt weiterhin zu einer besseren Einlagerung in die Membran. Durch die Komplexbildung mit divalenten Kationen (Ca^{2+}) wird die Penetrationsfähigkeit zusätzlich verstärkt (Seydlová & Svobodova, 2008).

Einen Hinweis auf die Membranaktivität von Pumilacidin A, C, E und dem Peptidlacton WF lieferten TEM-Aufnahmen sowie Analysen mit SYTOX green. Nach 48-stündiger Inkubation mit Rohextrakt bzw. den Reinsubstanzen waren die Bakterienzellen deformiert, zeigten Plasmolyse sowie „fädige“ Membranen und die Bildung großer Vesikel (ø 500 nm) an der bakteriellen Membran. OMVs sowie Flagellen waren im Gegensatz zu den Kontrollzellen nicht mehr

vorhanden (s. Abbildung 5.24). Eine offene Frage ist allerdings, warum bei den Methoden der MHK-Bestimmung und der mikroskopischen Betrachtung im TEM unterschiedliche Rangfolgen in Bezug auf die Aktivität der Peptidlactone auftraten. Im Rahmen der MHK-Bestimmung wies Pumilacidin C die höchste Aktivität auf. TEM-Aufnahmen identifizierten hingegen das Peptidlacton WF als aktivste Substanz. Für die TEM-Aufnahmen wurden zehnmal höhere Bakterienkonzentrationen eingesetzt und die Extraktkonzentration entsprechend angepasst. Dennoch wurden, im Gegensatz zur den MHK-Assays, nicht alle Bakterien vollständig nach 48 h abgetötet. Möglicherweise existiert ein Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit des Inhibitors und der Bakterienkonzentration in einem bestimmten Volumen. Aufgrund der geringen Substanzmenge konnten die Versuche nur einmal durchgeführt werden. Eine Wiederholung würde möglicherweise ein anderes Ergebnis liefern. Insgesamt zeigten die TEM-Aufnahmen sowie die Analyse mittels SYTOX green, dass es sich bei allen vier isolierten Peptidlactonen um membranaktive Substanzen handelt. Die 24-stündige Inkubation von *L. pneumophila* mit den Peptidlactonen und SYTOX green resultierte in einem Fluoreszenzanstieg. Der Farbstoff kann nur in Zellen mit beschädigter Plasmamembran eindringen. Das bedeutet, dass 12 µM der jeweiligen Substanz in der Lage waren, die Plasmamembran zu zerstören. Um den Wirkmechanismus näher zu analysieren sind jedoch zusätzliche Versuche, z.B. „black lipid membrane“ Experimente notwendig. Ein Zusammenbruch des Transmembran-Ionengradienten, z.B. durch porenbildende Substanzen, kann über Veränderungen der elektrischen Leitfähigkeit gemessen werden.

Ein Erklärungsansatz für die spezifische Aktivität der anti-*Legionella* Peptide ist die Tatsache, dass Legionellen im Gegensatz zu anderen Gram-negativen Bakterien, eine extrem hydrophobe Oberfläche besitzen und hiermit die allgemein 10-1000-fach höhere Empfindlichkeit gegenüber Detergenzien begründet wird (Verdon *et al.*, 2009). Da sich die Membranzusammensetzung bei Legionellen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase ändert, ist es außerdem von Interesse, die inhibitorische Wirkung der Peptidlactone bei exponentiellen bzw. stationären Legionellen zu analysieren. In der stationären Wachstumsphase liegen über 60 % verzweigte Fettsäuren vor und die Länge

der Fettsäuren in den Phospholipiden nimmt stark gegenüber der exponentiellen Wachstumsphase ab. Die Bedeutung der Membranzusammensetzung wurde bereits für Warnericin RK, ein weiteres anti-*Legionella* Peptid aus *Staphylococcus warneri* gezeigt. Legionellen der stationären Wachstumsphase waren wesentlich toleranter gegenüber Warnericin RK (Verdon *et al.*, 2008, 2011). Ähnlich zu Surfactin, zeigen hohe Konzentrationen an Warnericin RK eine Detergenzien-ähnliche Wirkung. Die bakterielle Membran wird destabilisiert und schließlich lysiert. Geringe Konzentrationen bewirken hingegen die Bildung von Kation-durchlässigen Poren sowie die Permeabilisierung der Membran (Marchand *et al.*, 2011). Obwohl es sich bei Warnericin RK um ein kationisches lineares Peptid handelt, besitzt es ein ähnlich spezifisches inhibitorisches Spektrum für *Legionella* spp. wie die Peptidlactone aus *B. pumilus*.

Glykolipid aus *B. pumilus* inhibiert *L. pneumophila*

Aus dem Zellsediment von *B. pumilus* wurde das neue Glykoglycerolipid 1-pentadecanoyl—3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-glycerol isoliert. Das Glycerolipid wirkte im Gegensatz zum Rohextrakt des Zellsediments mit 25 μ g/mL bakterizid auf *L. pneumophila* Corby. Glykoglycerolipide gehören zu den Glykolipiden und besitzen einen polaren Zuckeranteil und einen unpolaren Fettsäurerest. Sie sind ein wichtiger Bestandteil eukaryotischer und prokaryotischer Membranen und dienen als Energiespeicher (El Fadhli *et al.*, 2006). Es existieren einige wenige Studien, in denen eine Antitumor-Aktivität sowie eine schwache antibakterielle Wirkung für Glycerolipide nachgewiesen werden konnte (Maeda *et al.*, 2011, Misono *et al.*, 2003).

6.4 Einsatz von Liposomen zur Behandlung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen

In der heutigen Zeit können viele Infektionskrankheiten durch den Einsatz von Antibiotika behandelt werden, dennoch ist die Todesrate durch bakterielle Infektionen noch sehr hoch. Dies liegt u.a. an einem verstärkten Auftreten von Resistenzen gegen gängige Antibiotika sowie an der zeitaufwändigen und rückläufigen Entwicklung neuer Wirkstoffe. Eine besondere Herausforderung stellt die Behandlung von intrazellulären Erregern wie *Mycobacterium tuberculosis* oder *L. pneumophila* dar, die nicht nur vor dem wirtseigenen Immunsystem, sondern auch vor extrazellulären Antibiotika geschützt sind. Häufig zeigen Antibiotika *in vitro* eine gute Wirkung auf extrazelluläre Bakterien. Intrazellulär besitzen die Wirkstoffe jedoch nur einen schwachen Effekt, da sie nicht in der Lage sind Zellmembranen zu durchdringen, bei pH-Wert-Änderung inaktiviert werden oder durch Effluxpumpen aus der Zelle befördert werden (Pinto-Alphandary *et al.*, 2000). Aus diesem Grund werden neue Wirkstoffträgersysteme benötigt, die in der Lage sind eukaryotische Zellen zu penetrieren (Schneider, 1985). Eine Möglichkeit bietet die Verkapselung solcher extrazellulär hoch aktiven Wirkstoffe in Nanopartikeln oder Liposomen. Letztere stellen das natürliche Ziel von Makrophagen dar, wodurch eine gute Grundlage zur Behandlung intrazellulärer Infektionen mittels Liposomen als Arzneistoffträgersystem gebildet wird (Kelly *et al.*, 2011).

Für die Behandlung von Infektionen der unteren Atemwege werden vor allem membrangängige Chinolone wie Levofloxacin oder Ciprofloxacin sowie Makrolide oder Rifampicin eingesetzt. Chinolone werden schnell und gut in die Zellen aufgenommen, besitzen jedoch eine hohe Diffusionsrate und werden durch Effluxpumpen wieder aus den Zellen hinaus transportiert. Ein Nachteil bei Anwendung von Makroliden wie Azithromycin und Clarithromycin ist die meist nur bakteriostatische Wirkung. Gentamicin gehört zu den Aminoglykosidantibiotika und wirkt in sehr geringer Konzentration bakterizid auf eine Vielzahl Gram-negativer und einiger Gram-positiver Bakterien (Kadurugamuwa *et al.*, 1993, Frey & Löscher, 2007). Aufgrund der hohen Otho- und Nephrotoxizität sowie der geringen Membranpenetration findet Gentamicin

jedoch hauptsächlich Anwendung bei lokalen Haut- oder Augeninfektionen (Kumana *et al.*, 1994, Schneider & Richling, 2002). Eine Verkapselung in LS bietet die Möglichkeit den Vorteil der niedrigen MHK von Gentamicin (3,9 µg/mL nach 24 h) gegenüber Chinolonen (15-40 µg/mL nach 24 h) auszunutzen und die nachteilige Toxizität auf eukaryotische Zellen zu reduzieren (Jonas *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit wurde am Beispiel von Gentamicin, die Behandlung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen in Makrophagen und Lungenepithelzellen mit Liposomen der Firma Rodos BioTarget untersucht. Die Liposomen wurden entweder über „dual asymmetric centrifugation“ oder „reverse evaporation“ hergestellt und enthielten 40 % bzw. 10 % verkapseltes Gm. Nicht eingeschlossenes Gentamicin lag extrazellulär vor und wurde nur einmalig durch Dialyse einer DAC-Präparation abgetrennt. Alle Chargen wurden mit spezifischen Zuckerresten modifiziert, wodurch die Bindung an C-Typ Lektine auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) gefördert werden sollte. Die Aufnahme der Liposomen erfolgt anschließend über Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zielzellen (mündliche Information Dr. R. Gieseler, 2011).

Die Vermehrung von *L. pneumophila* über 24 h in U937 Makrophagen konnte erfolgreich durch die Behandlung mit Gm-beladenen DAC-LS-in-ex reduziert werden. Die Abnahme erfolgte in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Liposomen um bis zu 1,5 log Stufen im Vergleich zur Kontrolle mit extrazellulärem Gm. DAC-LS-in, bei denen extrazelluläres Gentamicin mittels Dialyse entfernt wurde, hatten keinen Effekt auf die bakterielle Vermehrung. Ein möglicher Grund für die fehlende Wirkung der dialysierten Charge könnte eine nicht exakt eingestellte Gm-Konzentration sein. Diese wurde lediglich über Bestimmung der Lipidkonzentration beider Chargen angeglichen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass bei der Dialyse einige LS oder das Coating beschädigt wurden und somit eine verringerte Aufnahme erfolgte. In Bezug auf die Verwendung von REV-LS ist zu beachten, dass nur 10 % des Antibiotikums verkapselt vorlagen. Aufgrund der Tatsache, dass bereits 1 mg/mL extrazelluläres Gm eine starke pH-Wert Verschiebung im Medium verursachte, konnten keine höheren Konzentrationen an REV-LS eingesetzt werden.

Rechnerisch gesehen, entsprechen 250 µg/mL DAC-LS-in-ex (40 % verkapselt) ungefähr 1 mg/mL REV-LS-in-ex (10 % verkapselt) und damit bei 70%iger Aufnahme in die Zelle ca. 70 µg/mL intrazellulärem Gm. Der Einsatz von 250 µg/mL DAC-LS-in/ex, 1 mg/mL REV-LS bzw. 1 mg/mL freiem Gm resultierte jeweils in der Abnahme der Bakterienzahl um 1 log-Stufe zur Kontrollinfektion. Dies legt nahe, dass DAC-LS besser aufgenommen werden als REV-LS. Warum bereits extrazelluläres Gm einen so starken Effekt auf die Vermehrung hatte, kann nur vermutet werden. Zum einen kann dies daran liegen, dass freies Gm nicht vollständig durch die Waschschriffe entfernt wurde. Weiterhin zeigten Immunfluoreszenzaufnahmen eine Präsenz von extrazellulärem Gm auf der Makrophagenoberfläche. Eventuell bindet das polykationische Gm bei hoher Dosierung an die im Allgemeinen negativ geladenen eukaryotischen Zellen (Mutsaers *et al.*, 1988). Nach Ausbruch aus der Wirtszelle, könnten die Legionellen schließlich mit ebendiesen Gm-Quellen in Kontakt kommen und degradiert werden. Die toxische Wirkung von 1 mg/mL Gm wurde in Zytotoxizitätsassays ausgeschlossen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass eine Schädigung von Wirtszellen vorliegt und dadurch die bakterielle Replikation negativ beeinflusst. Für weiterführende Studien ist es sinnvoll, das extrazelluläre Gm sowohl bei REV-LS als auch bei DAC-LS abzutrennen und mittels ELISA die tatsächliche intrazelluläre Gm-Konzentration zu bestimmen. Nur so sind ein exakter Vergleich der beiden Chargen und eine Abgrenzung zu freiem Gm möglich. Auch mit Hinblick auf die Nephro- und Othotoxizität sowie die Anwendung im Tiermodell ist die Abtrennung von extrazellulärem Antibiotikum von Vorteil. Durch die Verkapselung des Antibiotikums kommen die Zellen nicht mehr mit extrazellulärem Gentamicin in Kontakt, wodurch das toxische Potential herabgesetzt wird. Um die Wirkung von DAC-LS-in zu steigern existieren mehrere Möglichkeiten. Potential bietet z.B. die Optimierung der Beladungseffizienz. Oh *et al.* stellten bereits Liposomen mit einer Beladungseffizienz von 95 % her (Oh *et al.*, 1995). Weiterhin kann die Aufnahme durch Erhöhung der Ankerdichte sowie das Einfügen weiterer Liganden wie z.B. Peptiden oder Antikörpern erfolgen. So resultierte die Verwendung von GGP-Peptiden in einer 30-fach gesteigerten und selektiven Aufnahme der Liposomen in Neutrophile und Monozyten gegenüber Liposomen ohne Anker (Karathanasis *et al.*, 2009).

Dass die Behandlung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen mit Liposomen der Firma Rodos BioTarget erfolgsversprechend ist, zeigen Parallelen zur Studie von Sunamoto *et al.* im Jahr 1983. Hier waren mit Sisomycin beladene Liposomen ebenfalls in der Lage die *Legionella*-Infektion in humanen Monozyten und im Meerschweinchenmodell einzudämmen. Verwendet wurden große unilamellare Liposomen (LUVs), deren Oberfläche mit *O*-palmitoylamylopectin modifiziert wurde. Die Verkapselungsrate des Gm-ähnlichen Antibiotikums Sisomycin betrug ca. 36 %. Sunamoto *et al.* beobachteten ebenfalls, dass extrazelluläres Sisomycin einen Einfluss auf die Replikation hat. Im Unterschied zu den Infektionsstudien dieser Arbeit wurden die Zellen erst 24 h nach der Infektion mit Liposomen behandelt. Außerdem wurden die Liposomen nicht durch Waschschriffe entfernt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollinfektion bewirkte die Gabe von Liposomen mit intra und extrazellulärem Sisomycin eine Abnahme der Bakterienzahl um 3,5 log nach 2-tägiger Co-Inkubation. LS ohne extrazelluläres Gm konnten die Vermehrung nur um 2 log reduzieren. Nach 4 Tagen verstärkte sich der Effekt und die Vermehrung wurde jeweils um 4 bzw. 3,5 log-Stufen verringert (Sunamoto *et al.* 1983). Legionellen verlassen bereits nach 18 h die LCV brechen spätestens 24 h nach Infektion aus der Wirtszelle aus (Molmeret *et al.*, 2004). Die bessere Wirkung von Liposomen mit extrazellulärem Antibiotikum ist dadurch zu erklären, dass Liposomen ohne extrazelluläres Sisomycin bzw. Gm zunächst nur Legionellen erreichen, die sich im Zytoplasma der Wirtszelle befinden. Extrazelluläres Antibiotikum erreicht hingegen auch die Legionellen, die bereits aus der Wirtszelle ausgebrochen sind. *In vivo* Studien zeigten, dass die Liposomen von Sunamoto *et al.* in der Lage waren die *Legionella*-Infektion in Meerschweinchen erfolgreich zu bekämpfen. Meerschweinchen, die mit Liposomen behandelt wurden, bei denen 36 % verkapselt und 64 % extrazellulär vorlagen, überlebten die Infektion bei intravenöser Applikation. Eine intramuskuläre Gabe des der LS führte in 60 % der Fälle zum Tod der Tiere. Versuchstiere, die nur mit freiem Sisomycin behandelt wurden überlebten nicht (Sunamoto *et al.* 1983). Da DAC-LS-in/ex bereits nach 24 h in der Lage waren, die Bakterienzahl um 2,5 log im Vergleich zur unbehandelten Infektion zu reduzieren, scheinen DAC-LS effektiver als Sisomycin-haltige Liposomen zu

sein. Aus den Ergebnissen kann insgesamt abgeleitet werden, dass DAC-LS ebenfalls Potential zur Anwendung im Tiermodell besitzen.

Abbildung 6.5 zeigt ein Modell zum Ablauf einer *Legionella*-Infektion in Makrophagen nach Behandlung mit Gm-beladenen LS. Über spezifische Zuckerreste binden die Liposomen an C-Typ Lektin-Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche und werden über Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen. Im Anschluss folgt die Fusion mit Lysosomen und es kommt zur Freisetzung des Gm in das Zytoplasma der Wirtszelle (Barefood & Swaan, 2007, Gupta *et al.*, 2009). Aufgrund der Tatsache, dass Gm nicht membrangängig ist und sich Legionellen in einer membranhaltigen Vakuole befinden und vermehren, sind sie weiterhin vor dem Antibiotikum geschützt. Erst bei Lyse der Wirtszelle (18-24 h p.i.) kommen Legionellen mit Gm in Kontakt und werden abgebaut. Über die Immunogold Markierung von Gm könnte geklärt werden, wo sich das Gm in der Zelle befindet und zu welchem Zeitpunkt der Infektion ein Kontakt mit den Legionellen stattfindet.

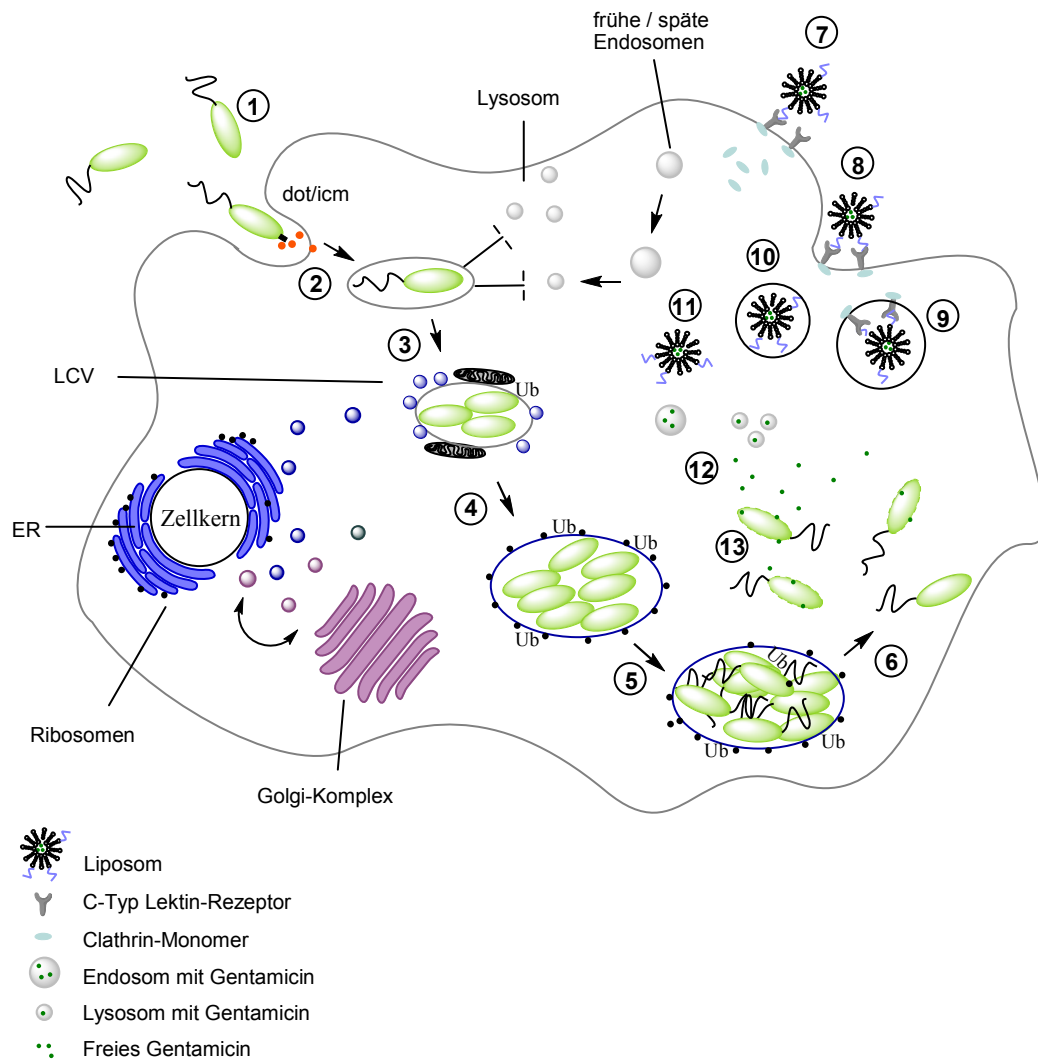


Abbildung 6.5: Modell zur Behandlung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen mit Liposomen der Firma Rodos BioTarget. Die Nummern 1-6 zeigen den Infektionszyklus von *Legionella*. Punkte 7-14 zeigen die Clathrin-vermittelte Endozytose von Liposomen und deren Interaktionsmöglichkeiten mit intrazellulären Legionellen. Über spezifische Zuckerreste auf der Liposomenoberfläche erfolgt die Bindung an C-Typ Lektin-Rezeptoren der Wirtszelle (7). Es folgt die Bildung von Clathrin-coated pits und die Einstülpung der Zellmembran (8). Clathrin-umhüllte Vesikel werden von der Zellmembran abgeschnürt (9). Schließlich werden die Clathrin-Monomere recycelt und an die Zellmembran zurückgeführt. Es verbleibt ein glattes Vesikel (10), das mit Lysosomen fusioniert. Durch die lysosomalen Enzyme werden die Lipide der Lysosomen degradiert und das Gm in die Zelle freigesetzt (11-12). Im Zytosol erfolgt der Abbau von Legionellen, die aus der LCV freigesetzt wurden (14).

Neben der *in vitro* Effizienz und der weiteren Optimierung der in dieser Arbeit vorgestellten LS, muss in Zukunft natürlich auch die Applikation in Tiermodellen getestet werden. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Liposomen einen entscheidenden Einfluss auf die Aufnahme in entsprechende Zielzellen haben. Durch Veränderung der Lipidzusammensetzung, der Größe, der Ladung oder durch Oberflächen-

modifikation von Liposomen kann z.B. gezielt eine längere Verweildauer im Blutstrom oder die Aufnahme in phagozytierende Zellen gefördert werden. Aus der Literatur geht jedoch hervor, dass starre, kugelförmige Partikel (Nanopartikel oder Liposomen) mit einer Größe von 100-200 nm das größte Potential für die Zirkulation im Organismus besitzen. Sie sind groß genug, um eine Aufnahme in die Leber zu umgehen und klein genug, um nicht von der Milz aufgenommen zu werden (Petros & DeSimone, 2010). REV-LS dieser Arbeit waren 100-200 nm groß und einheitlich rund geformt. DAC-LS bildeten hingegen ungleichmäßige Kugeln sowie längliche Schläuche von 50-200 nm im Durchmesser. *In vitro* zeigte sich kein negativer Einfluss auf die Aufnahme in Makrophagen. Es ist allerdings möglich, dass sich Unterschiede zwischen DAC-LS und REV-LS erst in *in vivo* Studien am Tiermodell niederschlagen.

Abschließend ist anzumerken, dass intrazelluläre Lungenpathogene möglicherweise gut über die Verabreichung von Wirkstoffen als Aerosol bekämpft werden können. Dies zeigten bereits Conley *et al.* 1997 in Versuchen, bei denen Mäuse mit *Francisella tularensis* infiziert und anschließend mit Ciprofloxacin-Aerosolen behandelt wurden. Ciprofloxacin-haltige Liposomen wirkten hierbei effektiver als die Verabreichung des Antibiotikums in freier Form. Die Applikation in Form von Ciprofloxacin-haltigen Liposomen als Aerosol könnte den Therapieerfolg von *Legionella*-Infektionen zusätzlich steigern.

7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Themengebiete behandelt: die Interaktion von Legionellen mit PMNs (I), die Charakterisierung einzelner Wirtszellfaktoren anhand von Mutanten des Modellorganismus *D. discoideum* (II), die Isolation antibakterieller Wirkstoffe aus *B. pumilus* (II) sowie der Einsatz von Liposomen zur Bekämpfung intrazellulärer *Legionella*-Infektionen (IV).

- (I) Virulente Legionellen induzieren einen inaktivierten Phänotyp in PMNs und werden, im Gegensatz zu avirulenten *E. coli* HB101, nicht vollständig durch die Leukozyten abgebaut. Die Versuche dieser Arbeit liefern die Grundlage um in weiterführenden Microarray- oder qRT-PCR-Analysen zu klären, inwiefern *L. pneumophila* in die Signaltransduktion und Genregulation zur Inaktivierung von PMNs eingreift. Die Durchführung eines Microarrays bietet die Möglichkeit zunächst ein Überblick über differenziell regulierte Gene zu gewinnen. Diese könnten anschließend mittels qRT-PCR verifiziert werden. Durch eine parallel durchgeführte Analyse des Proteoms könnte außerdem die Regulation auf Proteinebene untersucht werden. Über den Vergleich zur Proteomanalyse in *Dictyostelium* könnten wesentliche Unterschiede zwischen den Infektionen beider Phagozyten herausgestellt werden. Einige Pathogene wie *L. major* oder *C. pneumoniae* sind in der Lage die Lebensdauer von PMNs zu verlängern. Im Anschluss führt die Induktion von Apoptose zur „stillen Aufnahme“ in Makrophagen. Da die Aufnahme von apoptotischen Zellen normalerweise keine antibakteriellen Effektormechanismen aktiviert, können sich die Bakterien sehr effektiv in ihren finalen Wirtszellen vermehren (Lasky *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang ist es interessant zu klären, ob Legionellen ebenfalls einen ähnlichen Einfluss auf PMNs besitzen. Es ist bekannt, dass Makrophagen und PMNs interagieren. Aktivierte Neutrophile produzieren u.a. MIP-1 β , MIP-1 α , IL-8 und INF- γ . Diese Zytokine sind in der Lage Makrophagen, Monozyten, DC und NK zu aktivieren. Aktivierte Makrophagen produzieren ebenfalls TNF- α , IL-1 β , GM-CSF. Dies kann bei Neutrophilen die Lebensdauer von 6-12 h auf 24-48 h erhöhen.

Außerdem besitzen Neutrophile im Gegensatz zu Makrophagen Granula, die antimikrobielle Enzyme sowie Lactoferrin enthalten. Aus Studien geht hervor, dass Lactoferrin und MPO über PMNs in die Makrophagen aufgenommen werden und dort einen schnelleren Abbau von Pathogenen ermöglichen. Studien zur direkten Interaktion zwischen Makrophagen und PMNs wären interessant um zu klären, ob Legionellen die Apoptose in PMNs hinauszögern, ob die Aufnahme von *Legionella*-haltigen PMNs den Abbau in Makrophagen fördert oder erschwert und wie die Zytokinlevel der Zellpopulationen beeinflusst werden.

- (II) Die Analyse der *Dictyostelium*-Deletionsmutante *rpkA*⁻ zeigte, dass RpkA für den effizienten Abbau von virulenten und avirulenten Legionellen relevant ist und starke Auswirkungen auf den PI-Haushalt der Wirtszelle besitzt. Für die Aufklärung der Interaktion von RpkA mit der Wirtszelle ist es interessant anhand von Einzelmутanten die Bedeutung der GPCR und der Kinase-Domäne zu analysieren. Fluoreszenzmikroskopische Studien könnten Aufschluss darüber geben, ob die Anlagerung lysosomaler Marker während der Infektion mit Legionellen verzögert wird. Hierfür sollte das Zeitfenster bis ca. 34 h nach Infektion betrachtet werden. Life cell imaging einer Infektion könnte ebenfalls dazu beitragen, Informationen über die Anlagerung der V-H⁺-ATPase und lysosomalen Markern zu generieren. Durch die Überexpression von *atg9* wurde die protektive Wirkung des Autophagieproteins Atg9 auf die Infektion mit *L. pneumophila* gezeigt. Obwohl die Replikation in der Deletionsmutante *atg9*⁻ nicht beeinflusst wurde, verdeutlicht das vorliegende Ergebnis die Bedeutung von Autophagie für die Infektion. Mit Hilfe weiterer Deletionsmutanten könnte die Rolle von Autophagie detailliert untersucht werden. Die Proteine Atg11 und Atg17 sind an der Rekrutierung von Atg9 an die Phagophore beteiligt und stellen mögliche Kandidaten dar. Weitere Kandidaten sind Atg2 und Atg18, die an dem retrograden Transport beteiligt sind.

Die zusätzliche Punktmutation im Gen *cdcD* der Deletionsmutante *atg9*⁻ hatte keinen weiteren Einfluss auf die *Legionella*-Infektion. Andere Studien zeigen jedoch, dass CdcD entscheidend zur Etablierung der

replikativen Nische beiträgt (Shevchuck *et al.*, 2009, Dorer *et al.*, 2006). Daher sollte eine einfache *cdcD*-Deletionsmutante hergestellt werden um das bisherige Ergebnis der *atg9⁻/cdcD⁻*-Mutante zu überprüfen.

- (III) Die Peptidlactone Pumilacidin A, C, E und das neue Peptidlacton WF aus *B. pumilus* wirken mit hoher Spezifität bakterizid auf Gram-negative *Legionella* spp. und Gram-positive *S. pneumoniae* D39. Aufgrund der spezifischen Wirkung ist es von Interesse, den Wirkmechanismus des Lipopeptids für beide Bakterien aufzuklären. Die Erkenntnisse könnten einen Beitrag zur Entwicklung neuer Wirkstoffe oder dem Einsatz von Inhibitoren in Wassersystemen gegen zur Eliminierung von Legionellen beitragen. Grundlage zur Aufklärung des Wirkmechanismus sind größere Mengen der Reinsubstanzen. Da in dieser Arbeit lediglich bis zu 1,5 mg der jeweiligen Pumilacidine gewonnen wurden, müssen die Kulturbedingungen weiter optimiert werden. Dies kann z.B. über eine veränderte Medienzusammensetzung erfolgen. Naruse *et al.*, 1990 erzielten Ausbeuten von bis zu 2,36 g der jeweiligen Pumilacidine aus 12 L Kulturmedium. Eine weitere Möglichkeit ist die Sequenzierung des *B. pumilus*-Stammes und die anschließende Klonierung der entsprechenden Gene in einen *B. megaterium*-Expressionsstamm. Hierüber könnten gezielt große Mengen des jeweiligen Peptids produziert und isoliert werden. Weitere elektronenmikroskopische Aufnahmen sowie black membrane Experimente können im Anschluss zur Klärung des Wirkmechanismus in Legionellen bzw. Pneumokokken beitragen. Die Bedeutung der AS sowie des Fettsäurerestes sind hierbei ebenfalls von Interesse. Eventuell kann durch Modifikationen der AS oder der Fettsäure eine weitere Aktivitätssteigerung erzielt werden. Pumilacidin sowie Warnericin RK (Verdon *et al.* 2008, 2009, 2011) gehören zu den wenigen bisher bekannten Peptiden mit einer spezifischen Aktivität gegenüber Legionellen. Die Isolation weiterer spezifischer *Legionella*-Inhibitoren könnte zum Verständnis der Wirkmechanismen beitragen und schließlich die gezielte Synthese von anti-*Legionella*-Wirkstoffen ermöglichen. Mögliche Kandidaten hierfür

sind *Aeromonas*, *Pseudomonas* und weitere *Bacillus* Spezies, deren Aktivität auf *Legionella* bereits gezeigt wurde (Cotuk *et al.* 2005).

- (IV) Im Zusammenhang mit der Entwicklung neuer Wirkstoffe steht auch die Entwicklung von Wirkstoffträgersystemen. Die in dieser Arbeit eingesetzten, mit Gm beladenen Liposomen waren in der Lage die Replikation von *L. pneumophila* in Makrophagen erfolgreich zu verlangsamen und das nicht membrangängige Gm in die Zelle zu transportieren. Da jedoch keine vollständige Eliminierung der Infektion erreicht wurde, ist es von Interesse die Wirksamkeit der LS zu steigern. Dies kann z.B. über eine verbesserte Verkapselungsrate an Gm in die LS erreicht werden. Weiterhin kann die Bindung von Liposomen an die Zielzellen über den Einsatz zusätzlicher Oberflächenmodifikationen verbessert werden (s. Abschnitt 6.4). Die spezifische Bindung sollte zusätzlich über den Vergleich mit nicht modifizierten Liposomen bestätigt werden. Außerdem ist bisher unklar, wie und in welchem Zeitfenster das Gm aus den Liposomen in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt wird bzw. wann die Interaktion mit Legionellen stattfindet. Der Einsatz von Immunogold-Markierung gegen einen Gm-AK könnte Aufschluss über die Lokalisation und die Freisetzung des Gm geben. Hierzu müsste eine Zeitreihe von Präparaten hergestellt und im TEM betrachtet werden. Die Fragestellung, ob die mehrfache Behandlung infizierter Makrophagen (nach 2 h, 24 h, 48 h) eine vollständige Eliminierung der *Legionella*-Infektion bewirkt, ist ebenfalls von Interesse. Falls dies bestätigt werden kann, ist eine weitergehende Analyse im Tiermodell angebracht, um die spezifische Wirkung *in vivo* zu verifizieren.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

- Abu Kwaik Y.** (1996). The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Environ Microbiol* **62**(6): 2022-2028.
- Abu-Zant A, Jones S, Asare R, Suttles J, Price C, Graham J, Kwaik YA** (2007) Anti-apoptotic signaling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*. *Cell Microbiol* **9**(1):246-264.
- Adeleke A.A., Fields B.S., Benson R.F., Daneshvar M.I., Prucker J.M., Ratcliff R.M., Harrison T.G., Weyant R.S., Birtles R.J., Raoult D., Halablab M.A.** (2001) *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothanii*, sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(3):1151-1160.
- Adeleke A.A., Pruckler J., Benson R., Rowbotham T., Halablab M., Fields B.** (1996). *Legionella*-like amebal pathogens - Phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *J Infect Dis* **2**(3):225-230.
- Akhter A., Gavrilin M.A., Frantz L., Washington S., Ditty C., Limoli D., Day C., Sarkar A., Newland C., Butchar J., Marsh C.B., Wewers M.D., Tridandapani S., Kanneganti T-D., Amer A.O.** (2009). Caspase-7 activation by the Nlrc4/Ipaf inflammasome restricts *Legionella pneumophila* infection. *Plos Path* **5**(4): e1000361.
- Albert-Weissenberger C., Cazalet C., Buchrieser C.** (2007). *Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell Mol Life Sci* **64**(4): 432-448.
- Allen L-A.H.** (2003). Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. *Microbes and Infect* **5**:1329-1335.
- Alleron L., Merlet N., Lacombe C., Frere J.** (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* **57**(5):497-502.
- Alli O.A.T., Gao, L-Y, Pedersen, L.L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M., Abu Kwaik, Y.** (2000). Temporal Pore Formation-Mediated Egress from Macrophages and Alveolar Epithelial Cells by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **68**(11):6431–6440.
- Almagro J.C., Fransson J.** (2008). Humanization of antibodies. *Front Biosci* **13**:1619-1633.
- Amer A., Franchi L., Kanneganti T.D., Body-Malapel M., Ozoren N., Brady G., Meshinchi S., Jagirdar R., Gewirtz A., Akira S., Nunez G.** (2006) Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *JBC* **281**(46):35217-35223.
- Ang D.K.Y., Oates C.V.L., Schuelein R., Kelly M., Sansom F.M., e Bourges D., Boon L., Hertzog P.J., Hartland E.L., van Driel I.R.** (2010). Cutting edge: Pulmonary *Legionella pneumophila* is controlled by plasmacytoid dendritic cells but not type I IFN. *J Immun* **184**:5429-5433.

- Bakthavatsalam D., Brazill D., Gomer R.H., Eichinger L., Rivero F., and Noegel A.A.** (2007). A G protein-coupled receptor with a lipid kinase domain is involved in cell-density sensing. *Curr Biol* **17**:892-897.
- Banga S., Gao P., Shen X., Fiscus V., Zong W.X., Chen L., Luo Z.Q.** (2007). *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(12): 5121-5126.
- Bangham A.D., Horne R.W.** (1964). "Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope". *J Mol Biol* **8**:660–668.
- Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C.** (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* **13**:238–252.
- Bareford L.M., Swaan P.W.** (2007). Endocytosis mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **59**: 748-758.
- Baum H.v., Ewig S., Marre R., Suttorp N., Gonschior S., Welte T., Lück C.** (2008). Community-acquired *Legionella* pneumonia: New insights from german competence network for community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* **46**:1356-1364.
- Behnia R., Munro S.** (2005). Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**:597-604.
- Beiter K., Wartha F., Albiger B., Normark S., Zychlinsky A., Henriques-Normark B.** (2006). An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape extracellular traps. *Curr Biol* **16**:401–407.
- Bellinger-Kawahara C., Horwitz M.A.** (1990). Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J Exp Med* **172**:1201-1210.
- Berends E.T.M., Horswill A.R., Haste N.M., Monestier M., Nizet V., Köckritz-Blickwede M.** (2010). Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun* **2**:576-586.
- Bhardwaj J., Nash T.W., Horwitz M.A.** (1986). Interferon- γ -activated human monocytes inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *J Immunol* **137**:2662-69.
- Blasquez-Garrido, R.M., Parra F.J.E., Frances L.A., Guevara R.M., Sanchez-Nieto J.M., Hernandez M.S., Martinez J.A.S., Huerta F.H.** (2005). Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease: Levofloxacin versus Macrolides. *Clin Infect Dis* **40**:800-806.
- Bonner J.T., Lamont D.S.** (2005). Behavior of cellular slime molds in soil. *Mycologia* **97**(1):178-184.
- Boyer H.W. and Roulland-Dussoix D.** (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**(3):459-72.
- Bozue J.A., Johnson W.** (1996). Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosomes-lysosome fusion. *Infect Immun* **64**:668-673.

- Breiman RF, Butler JC** (1998) Legionnaires' disease: clinical, epidemiological, and public health perspectives. *Semin Respir Infect* **13**(2): 84-89.
- Brenner D.J., Steigerwalt A.G., McDade J.E.** (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Ann of Intern Med* **90**(4):656-658.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.** (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**:1532-1535.
- Brock D.A., Douglas T.E., Queller D.C., Strassmann J.E.** (2011). *Primitive agriculture in a social amoeba*. *Nature* **469**(7330):393-396.
- Brodhun B., Buchholz U.** (2011). Epidemiologie der Legionärskrankheit in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt **54**:680–687.
- Brüggemann H., Hagman A., Jules M, Sismeiro O., Dillies M.A., Gouyette C., Kunst F., Steinert M., Heuner K., Coppee J.Y., Buchrieser C.** (2006). Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **8**(8):1228-1240.
- Buchanan J.T., Simpson A.J., Aziz R.K., Liu G.Y., Kristian S.A., Kotb M., Feramisco J., Nizet V.** (2006). DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* **16**:396-400.
- Byrd T.F., Horwitz M.A.** (2000). Aberrantly low transferring receptor expression of human monocytes is associated with nonpermissiveness for *Legionella pneumophila* growth. *J Infect Dis* **181**:1394-1400.
- Byrne B., Swanson M.S.** (1998). Expression of *Legionella pneumophila* • virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun* **66**:3029-3034.
- Calvo-Carrido J., Carilla-Latore S., Kubohara Y., Santos-Rodrigo N., Mesquita A., Soldati T., Golstein P., Escalante R.** (2010). Autophagy in *Dictyostelium*. Genes and pathways, cell death and infection. *Autophagy* **6**(6):6866-701.
- Cardelli J.** (2001). Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: Phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic* **2**:311-320.
- Cassatella M.A., Bazzoni F., Flynn R.M., Dusi S., Trinchieri G., Rossi, F.** (1990). Molecular basis of Interferon- γ and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. *JBC* **265**(33): 20241-20246.
- Cecconi F., Levine B.** (2008). The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Develop Cell* **15**:344-357.
- Chua J., Vergne I., Master S. and Deretic V.** (2004). A tale of two lipids: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *Curr Opin Microbiol* **7**:71–77.
- Clarke M., Maddera L., Engel U., Gerisch G.** (2010). Retrieval of the vacuolar H⁺-ATPase from phagosomes revealed by live cell imaging. *PLoS One* **5**(1): e8585.
- Colombo M.I.** (2007). Autophagy: A pathogen driven process. *IUBMB Life* **59**(4-5):238-242.

- Cordeiro C., Wiseman D.J., Lutwyche P., Uh M., Evans J.C., Finlay B., Webb M.S.** (2000). Model Serovar Typhimurium intracellular infection against an *in vivo* *Salmonella enterica* Encapsulated in pH-sensitive liposomes. *AAC* 44(3):533-539.
- Dargemont C., Ossareh-Nazari B.** (2012). Cdc48/p97, a key actor in the interplay between autophagy and ubiquitin/proteasome catabolic pathways. *BBA* 1823(1):138-44.
- De Matteis M. A., Godi A.** (2004). PI-loting membrane traffic. *Nature Cell Biol* 6:487–492.
- De Matteis M. A., Godi A.** (2004). PI-loting membrane traffic. *Nat Cell Biol* 6:487–492.
- Declerck P.** (2010). Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* 12(3):557-66.
- Dees C., Fountain M.W., Taylor J.R., Schultz R.D.** (1985). Enhanced intraphagocytic killing of *Brucella abortus* in bovine mononuclear cells by liposomes-containing Gentamicin. *Veterin Immun and Immunopath* 8:171-182.
- Deretic V.** (2006). Autophagy in immunity and infection: A novel immune effector. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Deretic V., Levine B.** (2009). Autophagy, Immunity, and microbial adaptations. *Cell Host & Microbe* 5:527-549.
- Derre I. and Isberg R.R.** (2004). Macrophages from mice with the restrictive Lgn1 allele exhibit multifactorial resistance to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 72(11): 6221-6229.
- Diederer, B.M.** (2008) *Legionella* spp. and Legionnaires' disease, *J Infect* 56 (1):1-12.
- Donowitz G.R., Reardon I., Dowling J., Rubin L., Focht D.** (1990). Ingestion of *Legionella micdadei* inhibits human neutrophil function. *Infect Immun* 58(10):3307-3311.
- Dorer, M.S., Kirton, D., Bader, J.S., Isberg, R.R.** (2006). RNA interference analysis of *Legionella* in *Drosophila* cells: Exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Path* 2(4):315-327.
- Dorn B.R., Dunn W.A. Jr., Progulske-Fox, A.** (2002). Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol* 4(1):1-10.
- Dowling, J.N., Saha, A.K. and Glew, R.H.** (1992). Virulence factors of the family *Legionellaceae*. *Microbiol Rev* 56:32-60.
- Eichinger L., Pachebat J.A., Glockner G., Rajandream M.A., Sucgang R., Berriman M., Song J., Olsen R., Szafranski K., Xu Q., Tunggal B., Kummerfeld S., Madera M., et al.** (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435(7038): 43-57.
- Euzéby J.P.** List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Im Internet: <http://www.bacterio.cict.fr//Legionella.html>; Stand: März 2012.
- Farbrother P., Wagner C., Na J., Tunggal B., Morio .T, Urushihara H., Tanaka Y., Schleicher M., Steinert M., Eichinger L.** (2006). *Dictyostelium* transcriptional host cell response upon infection with *Legionella*. *Cell Microbiol* 8(3): 438-456.
- Fields B.S.** (1996). The molecular ecology of *Legionellae*. *Trends Microbiol* 4: 286–290.
- Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E.** (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 15:506–526.

- Fierer J., Hatlen L., Lin J.-P., Estrella D., Mihalko P., Yau-Young A.** (1990). Successful treatment using gentamicin liposomes of *S. dublin* infections in mice. *AAC* **34** (2):343-348.
- Fliermans, C.B. Cherry W.B., Orrison L.H., Smith S.J. Tison D.L. Pope D.H.** (1981). Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* **41**(1):9-16.
- Fraser D.W., Tsai T.R., Orenstein W., Parkin W.E., Beecham H.J., Sharrar R.G., Harris J., Mallison G.F., Martin S. M., McDade J.E.** (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* **297**:1189-1197.
- Frey H.-H., Löscher W.** (2007) Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, Sonderausgabe der 2. Auflage, Enke-Verlag.
- Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A.** (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *JCB* **176**:231-41.
- Gagnon E., Duclos S., Rondeau C., Chevet E., Cameron P.H., Steele-Mortimer O., Paiment J., Bergeron J.J., Desjardins M.** (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**:119-131.
- Gao L.Y., Abu Kwaik Y.** (1999). Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect Immun* **67**(9):4886-4894.
- Garduño, R.A., Hoffman P.S.** (1998). Surface-Associated Hsp60 Chaperonin of *Legionella pneumophila* Mediates Invasion in a HeLa Cell Model. *Infect Immun* **66**(10):4602.
- Gibson F.C. III, Tzianabos A.O., Rodgers F.G.** (1994). Adherence of *Legionella pneumophila* to U937 cells, guinea pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism. *Can J Microbiol* **40**:865–872.
- Gutierrez M.G., Master S.S., Singh S.B., Taylor G.A., Colombo M.I., Deretic V.** (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* **119**:753-766.
- Haranaga S., Tateyama M., Higa F., Miyagi K., Akime M., Azuma M., Yara S., Koide M., Fujiita J.** (2006). Intravenous Ciprofloxacin versus Erythromycin in the treatment of *Legionella* pneumonia. *Intern Med* 353-357.
- He C., Klionsky D.J.** (2009). Regulation mechanisms and signalling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* **43**:67-93.
- Hickey M.J., Kubes P.** (2009). Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol.* **9**:364-75.
- Hilbi H.** (2006). Modulation of phosphoinositide metabolism by pathogenic bacteria. *Cell Microbiol* **8**:1697–1706.
- Hilbi H., Weber S., Finsel I.** (2011). Anchors for effectors:subversion of Phosphoinositide lipids by *Legionella*. *Front Microbiol* **2**(91):1-8.
- Horwitz M.A., Silverstein S.C.** (1980). Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest* **66**(3):441-450.

- Horwitz M.A., Silverstein S.C.** (1981). Interaction of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes I. *L. pneumophila* resists killing by polymorphonuclear leukocytes, antibody, and complement. *J Exp Med* **153**, 386-397.
- Horwitz M.A.** (1983a). The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* **158**:2108-2126.
- Horwitz M.A.** (1983b). Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* **158**(4):1319-1331.
- Horwitz M.A.** (1984). Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* **36**:27-33.
- Horwitz M.A., Clemens D.L.** (1999). *Legionella pneumophila* and *Mycobacterium tuberculosis*. Two pathways through the mononuclear phagocyte. *Advances in Cell and Molecular Biology of membranes and Organelles* **6**:137-157.
- Horwitz M.A., Maxfield F.R.** (1984). *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *JCB* **99**:1936-43 127.
- Hubber A., Roy R.R.** (2010). Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu Rev Cell Biol* **26**:261-283.
- Husmann L.K. and Johnson W.** (1992). Adherence of *Legionella pneumophila* to guinea pig peritoneal macrophages, J774 mouse macrophages, and undifferentiated U937 human monocytes: role of Fc and complement receptors. *Infect Immun* **60**:5212-5218.
- Immordino M.L., Dosio F., Cattel L.** (2006). "Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential," *Internat J Nanomed* **1**(3):297-315.
- Ingmundson A., Delprato A., Lambright D.G. and Roy C.R.** (2007). *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* **450**:365-369.
- Jepras R.I. and Fitzgeorge R.B.** (1986). The effect of oxygen-dependent antimicrobial systems on strains of *Legionella pneumophila* of different virulence. *J Hyg Camb* **97**:61-69.
- Jesorka A., Orwar O.** (2008). Liposomes: Technologies and analytical applications. *Annu Rev. Anal Chem* **1**:801-832.
- Joller N., Weber S.S., Müller A.J., Spörri R., Selchow P., Sander P., Hilbi H., Oxenius A.** (2010). Antibodies protect against intracellular bacteria by Fc receptor-mediated lysosomal targeting. *PNAS* **107**:1-6.
- Joshi A.D., Swanson M.S.** (2011). Secrets of a successful pathogen: *Legionella* resistance to progression along the autophagic pathway. *Front Microbiol* **2**(138):1-9.
- Ju J.S., Fuentealba R.A., Miller S.E., Jackson E., Piwnica-Worms D., Baloh R.H., Weihi C.C.** (2009). Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *JCB* **187**(6):975-888.
- Kadurugamuwa J., Clarke A.J., Beveridge T.J.** (1993). Surface action of gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Bacteriol* **175**:5798-5805.
- Kagan J.C. and Roy C.R.** (2002). *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* **4**:945-954.

- Kagan J.C., Stein M.P., Pypaert M., Roy C.R.** (2004). *Legionella* subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle. *J Exp Med* **199**(9): 1201-1211.
- Kelly C., Jefferies C., Cryan S.-A.** (2010). Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. *J Drug Deliv* **2011**: 1-11.
- Kessin R.H.** (2001). *Dictyostelium* Evolution, cell biology, and the development of multicellularity. Cambridge University Press, 1-286.
- Khelef N., Shuman H. A., Maxfield F. R.** (2001). Phagocytosis of wild- type *Legionella pneumophila* occurs through a wortmannin-insensitive pathway. *Infect Immun* **69**:5157–5161.
- Kilvington S. and Price J.** (1990). Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J appl microbiol* **68**(5):519-525.
- Kimonis V.E., Fulchiero E., Vesa J., Watts G.** (2008). VCP disease associated with myopathy, Paget disease of bone and frontotemporal dementia: review of a unique disorder. *BBA* **1782**:744-748.
- Kimran Erdem, A., Yazici A.** (2008). An *in vitro* evaluation of the interactions of *Legionella pneumophila* serogroups 2 to 14 strains with other bacteria in the same habitat. *Ann Microbiol* **58**(3):395-401.
- Klemens S.P., Cynamon C.E., Swenson, Ginsberg R.S.** (1990) Liposome-encapsulated-gentamicin therapy of *Mycobacterium avium* complex infection in beige mice. *AAC* **34**:967-970.
- Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Buhl, C. L., Stahl, R. M., DeLeo, F. R.** (2002). Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:6901-6906.
- Krick R., Bremer S., Welter E., Schlotterhose P., Muehe Y., Eskelinen E.L., Thumm M.** (2010). Cdc48/p97 and Shp1/p47 regulate autophagosome biogenesis in concert with ubiquitin-like Atg8. *J Cell Biol* **190**:965–973.
- Kumana C.R., Yuen K.Y.** (1994). Parenteral aminoglycoside therapy: Selection, administration and monitoring. *Drugs* **47** (6):902-913.
- Laguna R.K., Creasey E.A., Li, Z., Valtz N., Isberg R.R.** (2006). A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:18745-18750.
- Lane D.J.** (1991). 16S/23S rRNA_sequencing, p. 115–175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- Levine B., Mizushima N., Virgin H.W.** (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**(7330):323-335.
- Li Si.I., Purugganan M.D.** (2011). The cooperative amoeba: *Dictyostelium* as a model for social evolution. *Trend Gen* **27**(2):48-54.
- Liu Y. and Luo Z.Q.** (2007). The *Legionella pneumophila* effector SidJ is required for efficient recruitment of endoplasmic reticulum proteins to the bacterial phagosome. *Infect Immun* **75**:592–603.

- Loomis W.F., Smith D.W.** (1990). Molecular phylogeny of *Dictyostelium discoideum* by protein sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci* **87**:9093-9097.
- Lutwyche P., Cordeiro C., Wiseman D.J., St-Louis M., Uh M., Hope M.J., Webb M.S., Finlay B.B.** (1998). Intracellular delivery and antimicrobial activity of Gentamicin encapsulated in pH-sensitive liposomes. *AAC* **42**(19):2511-2520.
- Machner M.P. and Isberg R.R.** (2007). A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science* **318**:974–977.
- Machner M.P., Isberg R.R.** (2006). Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev Cell* **11**(1): 47-56.
- Maeda N., Matsubara K., Yoshida H., Mizushima Y.** (2011). Anti-cancer effect of spinach glycolipids as angiogenesis inhibitors based on the selective inhibition of DNA polymerase activity. *Mini Rev Med Chem* **1**(1):32-38.
- Mandell L.A., Bartlett J.G., Dowell S.F., File T.M. Jr., Musher D.M., Whitney C.** (2003). Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. *Clin Infect Dis* **37**(11):1405-1433.
- Maniak M.** (2011). *Dictyostelium* as a model for human lysosomal and trafficking diseases. *Sem Cell Dev Biol* **22**(1):114-119.
- Marchand A., Verdon J., Lacombe C., Crapart S., Héchard Y., Berjeaud J.M.** (2011). Anti-*Legionella* activity of staphylococcal hemolytic peptides. *Peptides* **32**(5):845-851.
- Mari M., Griffith J., Rieter E., Krishnappa L., Klionsky D.J., Reggiori F.** (2009). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *JCB* **190**(6):1005-1025.
- Mari M., Reggiori F.** (2007a) Shaping membranes into autophagosomes. *Nat Cell Biol* **9**(10):1125-1127.
- Mari M., Reggiori F.** (2007b). Atg9 trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* **3**(2):145-148.
- Marston B.J., Lipman H.B., Breiman R.F.** (1994) Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med* **154**(21): 2417-2422.
- Martinelli S., Urosevic M., Daryadel A., Oberholzer P. A., Baumann C., Fey M. F., Dummer R., Simon H. U., Yousefi S.** (2004). Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *JBC* **279**:44123-44132.
- Massey A., Kiffin R., Cuervo A.M.** (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem & Cell Biol* **36**(12):2420-2434.
- Massing U., Cicko, S., Ziroli, V.** (2008). Dual asymmetric centrifugation (DAC)—A new technique for liposome preparation. *JCR* **125**(1):16–24.
- McCormack F.X. and Whitsett J.A.** (2002). The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest* **109**: 707-712.
- McDade J.E., Shepard C.C., Fraser D.W., Tsai T.R., Redus M.A., Dowdle W.R.** (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* **297**(22):1197-1203.

- McDonald B., Urrutia R., Yipp B.G., Jenne C.N., Kubes P.** (2012). Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* **13**(3):324-333.
- Meyer H., Bug M., Bremer S.** (2012). Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol* **14**:117-127.
- Miller R.D.** (1983). *Legionella pneumophila* cell envelope: permeability to hydrophobic molecules. *Curr Microbiol* **9**:349-354.
- Misono Y., Ishibashi M., Ito A.** (2003). Bahiensol, a new glycerolipid from a cultured myxomycete *Didymium bahiense* var. *bahiense*. *Chem Pharm Bull* **51**(5):612-613.
- Mizushima N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y.** (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**:107-132.
- Molmeret M., Bitar D. M., Han L., Kwai Y. A.** (2004). Disruption of the phagosomal membrane and egress of *Legionella pneumophila* into the cytoplasm during the last stages of intracellular infection of macrophages and *Acanthamoeba polyphaga*. *Infect Immun* **72**:4040-4051.
- Munakata, N. and Klionsky, D.J.** (2010). "Autophagy suite" Atg9 cycling in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Autophagy* **6**(6):679-685.
- Munimbazi C., Bullerman, L.B.** (1998). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J App Microbiol* **84**:959-968.
- Murata K., Miyamoto H., Hamada T., Ogawa m., Taniguchi H., Yoshida S. (1998). Entry and intracellular growth of *Legionella dumoffii* in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* **157**(1):1967-1974.
- Murata T., Delprato A., Ingmundson A., Toomre D.K., Lambright D.G., Roy C.R.** (2006). The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat Cell Biol* **8**:971–977.
- Mutsaers S.E., Papadimitriou J.M.** (1988) Surface charge of macrophages and their interaction with charged particles. *J Leuc Biol* **44**:17-26.
- Nagai H., Kagan J.C., Zhu X., Kahn R.A. and Roy C.R.** (2002). A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* **295**:679–682.
- Naruse N., Tenmyo O., Kobaru S., Kamei H., Miyaki T., Konishi M.** (1990). Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics: production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *J Antibiot* **43**:267-280.
- Nash T.W., Libby D.M., Horwitz M.A.** (1988). INF-gamma-activated human alveolar macrophages inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *J Immunol* **140**:3978-3981.
- Neunuebel M.R., Chen Y., Gaspar A.H., Backlund P.S., Yergey A., Machner M.** (2011). De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* **333**:453-456.
- Newton H. J., Ang D.K.Y., van Driel I.R., Hartland E.L.** (2010). Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev* **23**(2):274-98.

- Noda T., Yoshimori T.** (2009). Molecular basis of canonical and bactericidal autophagy. *Intern Immunol* **21**(11):1199-1204.
- Ongena M. and Jacques P.** (2007). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiol* **16**(3):115-125.
- Otto G.P., Wu M.Y., Clarke M., Lu H., Anderson O.R., Kessin R.H.** (2003). Macroautophagy is required for cellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*, **278**:17636-17645.
- Otto G.P., Wu M.Y., Clarke M., Lu H., Anderson O.R., Hilbi H., et al.** (2004b). Macroautophagy is dispensable for intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Microbiol*, **51**:63-72.
- Otto G.P., Wu M.Y., Kazgan N., Anderson O.R., Kessin R.H.** (2004a). Dictyostelium macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental effects. *J Biol Chem*, **279**:15621-15629.
- Palusińska-Szys M., Janczarek M.** (2010). Innate immunity to *Legionella* and Toll-like receptors. *Folia Microbiol* **55**:508-11.
- Parashar A., Bhatia S., Tabatabaeiyazdi Z., Duncan C., Garduño R.A., Tang P., Low D.E., Guyard C., Terebiznik M.R.** (2012). Mechanism of invasion of lung epithelial cells by filamentous *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **14**(10):1632–1655.
- Pareira de Melo, F.M., Fiore M.F., Beraldo de Moraes, A.B., Silva-Stenico, M.E., Scramin S., de Araujo Texeira, M., Soares de Melo, I.** (2009). Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. *Sci Agric* **66**(5):583-592.
- Park D.R. and Skerrett S.J.** (1996). IL-10 enhances the growth of *Legionella pneumophila* in human mononuclear phagocytes and reverses the protective effect of INF- γ . Differential responses of blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* **157**: 2528-2538.
- Payne N.R. and Horwitz M.A.** (1987). Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med* **166**:1377-1389.
- Peracino B., Buracco S., Bozzaro S.** (2012). The Nramp (Slc1) proteins regulate development, resistance to pathogenic bacteria and iron homeostasis in *Dictyostelium discoideum*. *JCS*.116210.
- Petros A. P., DeSimone J.M.** (2010) Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Disc* **9**:615-627.
- Pinto-Alphondary H., Andreumont A., Couvreur P.** (2000). Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *IJAA* **13**:155-168.
- Pizarro-Cerda J., Cossart P.** (2004). Subversion of Phosphoinositide metabolism by intracellular bacterial pathogens. *Nat Cell Biol* **6**(11):1026-1033.
- Ragaz C., Pietsch H., Urwyler S., Tiaden A., Weber S.S., Hilbi H.** (2008). The *Legionella pneumophila* phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits ER vesicles to a replication-permissive vacuole. *Cell Microbiol* **10**(12):2416-2433.
- Ramm W., Schatton W., Wagner-Döbler I., Wray V., Nimtz M., Tokuda H., Enjyo F., Nishino H., Beil W., Heckmann R., Lurtz V., Lang S.** (2004). Diglucosyl-glycerolipids from the marine

sponge-associated *Bacillus pumilus* strain AAS3: their production, enzymatic modification and properties. *App Microbiol Biotechnol* **64**(4):497-504.

Ranade V.V. und Cannon J.B. (2011). Drug delivery systems, 3rd edition, CRC Press, Taylor and Francis Group.

Rebele J.G. (2010). Vergleichende Untersuchungen zur *Legionella*-Wirtszell-Interaktion. Bachelorarbeit, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig.

Rechnitzer C. and Blom J. (1989). Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species. *APMIS* **97**:105–14.

Rechnitzer C. and Kharazmi A. (1992). Effect of *Legionella pneumophila* cytotoxic protease on human neutrophil and monocyte function. *Microb Pathog* **12**:115-125.

Rink L., Kruse A., Haase H. (2012). Immunologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag 2011.

Ritz C., Spiess A-N. (2008). qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Oxford University Press* 1-3.

Riyahi T.Y., Frese F., Steinert M., Omosigh N.N., Glöckner G., Eichinger L., Orabi B., Williams R.S.B., Noegel A.A. (2011). RpkA, a highly conserved GPCR with a lipid kinase domain has a role in pathogenesis and anti-bacterial defense. *PLoS One* **6**(11): e27311.

Robert Koch Institut (2012). Epidemiologisches Bulletin Nr. 50. Aktuelle Daten zu Infektionskrankheiten und Informationen zu public health. 50/2012:499-510.

Robinson C.G., Roy C.R. (2006). Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **8**(5):793-805.

Roth B.L., Poot M., Yue S.T., Millard P.J. (1997). Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *App Envir Microbiol* **63**(6):2421-2431.

Rowbotham T.J. (1986). Current views on the relationships between amoebae, *Legionellae* and man. *Isr J Med Sci* **22**(9): 678-689.

Roy, C.R. (2002). Exploitation of the endoplasmic reticulum by bacterial pathogens. *Trends in Microbiol* **10**(9):418-424.

Rubinstein D.C., Shpilka T., Elazar Z. (2012). Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol* **22**(1):R29-34.

Rupp J., Pfeiderer L., Jugert C., Moeller S., Klinger M., Dalhoff K., Solbach W., Stenger S., Laskay T., van Zandbergen G. (2009). *Chlamydia pneumoniae* hides inside apoptotic neutrophils to silently infect and propagate in macrophages. *Plos One* **4**(6):1-8.

Santic M., Asare R., Doric M., Abu Kwaik Y. (2007). Host-dependent trigger of caspases and apoptosis by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **75**(6):2903-2913.

Schaap P. (2011). Evolutionary crossroads in developmental biology: *Dictyostelium discoideum*. *Development* **138**:387-396.

Scharf S., Vardarova K., Lang F., Schmeck B., Opitz B., Flieger A., Heuner K., Hippenstiel S., Suttorp N., N'Guessan P.D. (2010). *Legionella pneumophila* induces beta Defensin-3 in pulmonary cells. *Respir Res* **11**(93).

- Schiffelers R., Storm G., Bakker-Woudberg I.** (2001). Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical studies. *J Antimicrob Chemother* **48**:333-344.
- Schmeck B., N'Guessan P.D., Ollomang M., Lorenz J., Zahlten J., Opitz B., Flieger A., Suttorp N., Hippenstiel S.** (2007). *Legionella pneumophila*-induced NF- κ B and MAPK-dependent cytokine release by lung epithelial cells. *Eur Respir J* **29**:25-33.
- Schneider D., Richling F.** (2002). Checkliste Arzneimittel A-Z über 520 komplette Wirkstoffprofile, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 202-203.
- Schneider M.** (1985), Liposomes as drug carriers: 10 years of research. In: Buri, P., Gumma, A. (eds): Drug targeting. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 119-134.
- Schroit A.J., Madsen J., Nayar R.** (1986). Liposome-cell interactions: in vitro discrimination of uptake mechanism and in vivo targeting strategies to mononuclear phagocytes. *Chemistry and Physics of Lipids* **40**:337-93.
- Schubert R.** (2010). Liposomen. In: Mäder K, Weidenauer U., Innovative Arzneiformen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 149-163.
- Seeger E.M., Thuma M., Fernandez-Moreira E., Jacobs E., Schmitz M., Helbig J.H.** (2010) Lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* shed in a liquid culture as a nonvesicular fraction arrests phagosome maturation in amoeba and monocytic host cells. *FEMS Microbiol Lett* **307**:113-119.
- Segal, A.W.** (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **23**:197-223.
- Sessa G., Weissmann G.** (1968). Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res* **9**:310–318.
- Seydlová G., Čabala R. Svobodová J.** (2011). Surfactin - Novel Solutions for Global Issues. Biomedical engineering, trends, research and technologies. Dr. Sylwia Olsztyńska (Ed.)
- Shevchuck O., Batzilla C., Hägele S., Kusch H., Engelmann S., Hecker M., Haas A., Heuner K., Glöckner G., Steinert, M.** (2009). Proteomic analysis of *Legionella*-containing phagosomes isolated from *Dictyostelium*. *Int J of Med Microbiol* **299**:489-508.
- Shevchuck O., Jäger J., Steinert M.** (2011). Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Front Microbiol* **2**(74):1-12.
- Sin S., Roy C.R.** (2008). Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **10**(6):1209-1220.
- Solomon J.M. and Isberg R.R.** (2000). Growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum* as a novel system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Trends in Microbiol* **8**(10):478-480.
- Steffensen D.O., Weinbaum D.L., Dowling J.N.** (1985). Opsonic requirements for phagocytosis of *L. micdadei* by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **49**(5):695-699.
- Stein T.** (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* **56**(4):845-857.
- Steinert M.** (2011). Pathogen–host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Seminars in Cell & Dev Biol* **22**(1):70-76.

- Stone B.J. and Abu Kwaik Y.** (1998). Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* **66**(4): 1768-1775.
- Stout J.E. and Yu V.L.** (1997). Legionellosis. *New Engl J of Med* **337**(19):682-687.
- Sturgill-Koszycki S. and Swanson M.S.** (2000). *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp Med* **192**:1261-1272.
- Subrahmanyam, Y.V.B.K., Yamaga, S., Prashar, Y., Lee, H. H., Hoe, N. P., Kluger, Y., Gerstein, M., Goguen, J. D., Newburger, P. E., Eissman, S. M.** (2001). RNA expression patterns change dramatically in human neutrophils exposed to bacteria. *Blood* **97**(8):2457-2468.
- Sunamoto J., Goto M., Iida T., Hara K., Saito A., Tomonaga A.** (1983). Unexpected tissue distribution of liposomes coated with amylopectin derivatives and successful use in the treatment of experimental Legionnaires' diseases in Gregoriadis G., Poste G., Senior J., Trouet A. Receptor-mediated targeting of drugs **82**:359-371.
- Sundiin D.P., Sandoval R., Moilitoris B.A.** (2001). Gentamicin inhibits renal protein and phospholipid metabolism in rats. Implication involving intracellular trafficking. *J of the Amer Soc of Nephrol* **12**(1):114-123.
- Swanson M.S. and Hammer B.K.** (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* **54**: 567-613.
- Swanson M.S., Isberg R.R.** (1995). Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* **63**:3609-3620.
- Swenson C.E., Popescu M.C., Ginsberg R.S.** (1988). Preparation and use of liposomes in the treatment of microbial infections. *Crit Rev Microbiol* **15** Supplement 1.
- Szoka F.Jr., Papahadjopoulos D.** (1978) Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci* **75**(9):4194-4196.
- Tachado S.D., Samrakandi M.M., Cirillo J.D.** (2008). Non-opsonic phagocytosis of *Legionella pneumophila* by macrophages is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Plos One* **3**(10):e3324.
- Tateda K., Moore T.A., Newstead M.W., Tsai W.C., Zeng X., Deng J.C., Chen G., Reddy R., Yamaguchi K., Standiford T.J.** (2001). Chemokine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of Legionella pneumonia: Potential role of neutrophils as immunoregulatory cells. *Infect Immun* **69**(4):2017-2024.
- Taylor M., Ross K., Bentham R.** (2009). *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol* **58**(3):538-47.
- Temmermann R., Vervaeren H., Noseda B., Boon N. Verstraete W.** (2007). Inhibition of *Legionella pneumophila* by *Bacillus spec.* *Eng Life Sci* **7**(5):497-503.
- Teruya H., Higa F., Akamine M., Ishikawa C., Okudaira T., Tomimori K., Mukaida N., Tateyama M., Heuner K., Fujita J., Mori N.** (2007). Mechanisms of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression in human lung epithelial cells. *BMC* **7**:102.

- Teruya H., Higa F., Akamine M., Ishikawa C., Okudaira T., Tomimori K., Mukaida N., Tateyama M., Heuner K., Fujita J., Mori N.** (2011). Correction: Mechanisms of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression in human lung epithelial cells. *BMC* **11**:136.
- Thumm M., Klionsky D.J.** (2011). New thoughts regarding Atg8 and ubiquitination. *Autophagy* **7**(2):125-126.
- Tilney L.G., Harb O.S., Connelly P.S., Robinson C.G. and Roy C.R.** (2001). How the parasitic bacterium *L. pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *JCS* **114**:4637-4650.
- Torchilin V.P.** (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev* **4**:145-160.
- Tresse E., Salomons F.A., Vesa J., Bott L.C., Kimonis V., Yao T.P. Dantuma N.P., Taylor J.P.** (2010). VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD. *Autophagy* **6**:1-11.
- Tsai T.F., Finn D.R., Plikaytis B.D., McCauley W., Martin S.M., Fraser D.W.** (1979). Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia. *Ann Intern Med* **90**(4):509-517.
- Tsukahara Y., Lian Z., Zhang X., Whitney C., Kluger Y., Tuck D. Yamaga S., Nakayama Y., Weissman S.M., Newburger P.E.** (2003). Gene expression in human neutrophils during activation and priming by bacterial lipopolysaccharide. *JCB* **89**:848-861.
- Tung S.M., Unal C., Ley A., Pena C., Tunggal B., Noegel A.A., et al.** (2010). Loss of *Dictyostelium* ATG9 results in a pleiotropic phenotype affecting growth, development, phagocytosis and clearance and replication of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **12**(6):765-780.
- Ünal C, Steinert M.** (2006). *Dictyostelium discoideum* as a model to study host-pathogen interactions. *Methods Mol Biol* **346**:507-515.
- Van den Bout G., Divecha N.** (2009). PIP5K-driven PtdIns(4,5)P₂ synthesis: regulation and cellular functions. *J Cell Sci* **122**(21):3837-3850.
- Van Zandbergen G., Gieffers J., Kothe H., Rupp J., Bollinger A., Aga E., Klinger M., Brade H., Dalhoff K., Maass M., Solbach W., Laskay T.** (2004). *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J Immunol* **172**:1768-1776.
- Vandesompele J., de Preter K., Pattyn F., Poppe B., van Roy N., de Paepe A., Speleman F.** (2002). *Gen Biol* **3**(7).
- Verbrugh, H.A., Lee, D.A. and Elliott, G.R.** (1985). Opsonization of *Legionella pneumophila* in human serum: Key roles for specific antibodies and the classical complement pathway. *Immunol* **54**:643-653.
- Verdon J., Falge M., Maier E., Bruhn H., Steinert M., Faber C., Benz R., Héchard Y.** (2009). Detergent-like activity and α -helical structure of Warnericin RK, an anti-*Legionella* peptide. *Biophys J* **97**:1933–1940.

- Verdon J., Labanowski J., Sahr T., Ferreira T., Lacombe C., Buchrieser C., Berjeaud J.-M., Héchard Y.** (2011). Fatty acid composition modulates sensitivity of *Legionella pneumophila* to warnericin RK, an antimicrobial peptide. *BBA* **1808** (4):1146-1153.
- Viner R., Chetrit D., Ehrlich M., Segal G.** (2012). Identification of two *Legionella pneumophila* effectors that manipulate host phospholipids biosynthesis. *PLoS Pathog* **8**(11):e1002988.
- Vinzing M., Eitel J., Lippmann J., Hocke A.C., Zahlten J., Slevogt H., N'Guessan P.D., Gunther S., Schmeck B., Hippenstiel S., Flieger A., Suttrop N., Opitz B.** (2008) NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells. *J Immunol* **180**(10):6808-6815.
- Virgin H.W., Levine B.** (2009). Autophagy genes in immunity. *Nat Immunol* **10**:461-470.
- Voigt R.** (2010). Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf, 11. Auflage Deutscher Apotheker Verlag.
- von Köckritz-Blickwede M., Chow O., Ghochani M., Nizet V.** (2010) Visualization and functional evaluation of phagocyte extracellular traps. *Methods microbiol* **37**:139-160.
- von Köckritz-Blickwede M., Nizet N.**(2009). Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J Mol Med* **87**:775-783.
- Hongpeng Wang** (2012). Bioactive surfactants and further new secondary metabolites from marine and terrestrial bacteria. ISBN : 978-3868444469
- Wartha F. and Henriques-Normark B.** (2008) ETosis:A novel cell death pathway. *Sci Signal* **1**(21):pe25.
- Wartha F., Beiter K., Normark S., Henriques-Normark B.** (2007). Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **10**:52-56.
- Weber S.S., Ragaz C., Hilbi H.** (2009b). The inositol polyphosphate 5-phosphatase OCRL1 restricts intracellular growth of *Legionella*, localizes to the replicative vacuole and binds to the bacterial effector LpnE. *Cell Microbiol* **11**(3): 442-460.
- Weber S.S., Ragaz C., Hilbi H.** (2009a). Pathogen trafficking pathways and host phosphoinositide metabolism. *MicroRev* **71**(6):1341-1352.
- Weber S.S., Ragaz C., Reus K., Nyfeler Y., Hilbi H.** (2006). *Legionella pneumophila* exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *PLoS Pathog* **2**(5): e46.
- Weinrauch, Y., Drujan D., Shapiro S.D., Weiss J., Zychlinsky A.** (2002) Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* **417** (6884):91–94.
- Wiedemann C., Schulz H.L., Weber B.H.F.** (2004). Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung. *BIOSpektrum* **1**/04:99-102.
- Williams R.S., Boeckeler K., Gräf R., Müller-Taubenberger A., Li Z., Isberg R.R., Wessels D., Soll D.R., Alexander H., Alexander S.** (2006). Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends Mol Med* **12**(9):415-425.
- Xie Z., Klionsky D.J.**(2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**:1102-1109.
- Xie Z., Nair U., Klionsky D.J.** (2008). Atg8 controls phagophore Expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* **19**:3290-3298).

- Xu L., Shen X., Bryan A., Banga S., Swanson M.S. and Luo Z.Q.** (2010). Inhibition of host vacuolar H⁺-ATPase activity by a *Legionella pneumophila* effector. *PLoS Pathog* **6**(3).
- Yamamoto H., Kakuta S., Watanabe T.M., Kitamura A., Sekito T., Kondo-Kakuta C., Ichikawa R., Kinjo M., Ohsumi Y.** (2012). Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *JCB* **198**(2):219-233.
- Yamanaka, Y., Sasagawa Y. Ogura T.** (2011). Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *BBA* **1823**:130-137.
- Yu V.L., Greenberg R.N., Zadeikis N., Stout J.E., Khashab M.M. Olson W.H., Tennenberg A.M.** (2004). Levofloxacin efficacy in the treatment of community-acquired Legionellosis. *Chest* **125**(6):2135-21359.
- Yu V.L., Plouffe J.F., Pstoris M.C., Stout J.E. Schoesboe M., Widemer A., Summersgill J., File T., Heath C.M., Paterson D.L. Chereshsky A.** (2002). Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired Legionellosis: An international collaborative survey. *J Infect Dis* **186**:127-128.
- Yuk J.-M., Yoshimori T., Jo E.-K.** (2012). Autophagy and bacterial infectious diseases. *Exp Mol Med* **44**(2):99-108.
- Zhang X., Kluger y., Nakayama Y., Poddar R., Whitney C., DeTora A., Weissman S.M., Newburger P.E.** (2004). Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* **75**:358-372.
- Zhong B., Jiang K., Gilvary D.L., Epling-Burnette P.K., Ritchey C., Liu J., Jackson R.L., Hong-Geller E., Wei S.** (2003). Human neutrophils utilize a Rac/Cdc42-dependent MAPK pathway to direct intracellular granule mobilization toward ingested microbial pathogens. *Blood* **101**:3240-3248.
- Zündorf I., Vollmar A., Dingermann T.** (2007). Grundprinzipien des Immunsystems. *Deutsche Apothekerzeitung* **147**(11):53-68.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung von Phagozytose und ETosis zum Abbau von Mikroorganismen durch PMNs.....	13
Abbildung 2.2: Intrazellulärer Infektionszyklus von <i>Legionella</i> . 1: Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle.....	16
Abbildung 2.3: Lebenszyklus von <i>D. discoideum</i> (www.dictybase.org).....	20
Abbildung 2.4: Grundstruktur von Phosphoinositiden (A). Enzymatische Bildung der sieben PI-Derivate über Kinasen, Phosphatasen und Phospholipasen (B)	22
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Autophagie in <i>Dictyostelium</i>	26
Abbildung 2.6: Liposom als Wirkstoffträgersystem.....	32
Abbildung 2.7: Aufnahme von Liposomen und Wirkstofffreisetzung in eukaryotischen Zellen. .	33
Abbildung 4.1: Isolation von mononuklearen Zellen über einen Ficoll-Gradienten.	68
Abbildung 4.2: Histopaque / Ficoll-Gradient zur Isolation polymorphkerniger Leukozyten.	69
Abbildung 5.1: Infektion von humanen Zellen und Zell-Linien mit <i>L. pneumophila</i> Corby.....	88
Abbildung 5.2: Infektionsstudien von humanen PMNs mit <i>L. pneumophila</i> Corby und <i>E. coli</i> HB101.	91
Abbildung 5.3: Gelelektrophoretische Bestimmung der RNA-Integrität von PMNs mittels Bioanalyzer.	93
Abbildung 5.4: Box-Plot einer qRT-PCR von PMNs nach Infektion mit <i>L. pneumophila</i> Corby.	95
Abbildung 5.5: DNase-Test von stationären <i>L. pneumophila</i> -Kulturen.....	96
Abbildung 5.6: Induktion von NETs in humanen PMNs.....	97
Abbildung 5.7: Fluoreszenzmikroskopie: Infektion von <i>D. discoideum</i> <i>rpkA</i> ⁻ mit..... <i>L. pneumophila</i> JR32.	100
Abbildung 5.8: Infektionsstudien mit <i>L. pneumophila</i> JR32 in der <i>D. discoideum</i> Deletionsmutante Mutante	101
Abbildung 5.9: Infektionsstudien mit <i>L. hackeliae</i> und <i>L. pneumophila</i> JR32 <i>dotA</i> ⁻ in der <i>D. discoideum</i> Deletionsmutante <i>rpkA</i> ⁻	102
Abbildung 5.10: Vermehrung von <i>D. discoideum</i> <i>atg9</i> ⁻ sowie den Komplementanten AAG1 und AGA5.....	104
Abbildung 5.11: Invasion von <i>L. pneumophila</i> Corby in <i>D. discoideum</i> 4 h nach Infektion.	105
Abbildung 5.12: Fluoreszenzmikroskopie der Infektion von den <i>D. discoideum</i> <i>atg9</i> ⁻ Komplementanten AAG1 und AGA5 mit <i>L. pneumophila</i> Corby mcherry.	106
Abbildung 5.13: Infektionsstudien mit <i>L. pneumophila</i> Corby in verschiedenen <i>D. discoideum</i> -Stämmen.....	107
Abbildung 5.14: Vermehrung und Fruchtkörperbildung der <i>D. discoideum</i> Doppelmutante <i>atg9</i> ⁻ / <i>cdcD</i> ⁻	109
Abbildung 5.15: Invasionsstudien mit <i>L. pneumophila</i> Corby in der <i>D. discoideum</i> Mutante <i>atg9</i> ⁻ / <i>cdcD</i> ⁻	110

Abbildung 5.16: Infektionsstudien mit <i>L. pneumophila</i> Corby in der <i>D. discoideum</i> Mutante <i>atg9/cdcD</i>	111
Abbildung 5.17: Fluoreszenzmikroskopie der Infektion von <i>D. discoideum atg9/cdcD</i> mit <i>L. pneumophila</i> Corby-GFP.	112
Abbildung 5.18: Hemmung von <i>L. pneumophila</i> Corby durch <i>B. pumilus</i>	114
Abbildung 5.19: Dünnschichtchromatogramme der Agar- und Flüssigextraktion von <i>B. pumilus</i>	117
Abbildung 5.20. Chemisches Screening von <i>B. pumilus</i> Rohextrakt (Agarextraktion) durch HPLC-MS.	119
Abbildung 5.21: Isolation von Peptiden aus <i>B. pumilus</i> -Kulturüberstand mit bakterizider Wirkung auf <i>Legionella</i>	120
Abbildung 5.22: Chromatogramm der semi-präparativen HPLC von Peptidfraktion 14 aus <i>B. pumilus</i> DKS1-Kulturüberstand.	121
Abbildung 5.23: Struktur von Pumilacidin A, C, E sowie dem neuen Peptidlacton aus <i>B. pumilus</i> DKS1-Kulturüberstand.	123
Abbildung 5.24: TEM von <i>L. pneumophila</i> nach Inkubation mit <i>B. pumilus</i> -Rohextrakt (A) sowie daraus isolierten Reinsubstanzen (B).	127
Abbildung 5.25: SYTOX green Assay zur Bestimmung der Membranpermeabilität von <i>L. pneumophila</i> Corby durch Pumilacidin A, C, E und dem neuen Peptidlacton WF aus <i>B. pumilus</i>	128
Abbildung 5.26: Isolation des neuen Glykolipids 1-pentadecanoyl—3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-glycerol aus <i>B. pumilus</i> -Zellsediment.	129
Abbildung 5.27: Struktur des neuen Glykolipids 1-pentadecanoyl—3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-glycerol aus dem Zellsediment von <i>B. pumilus</i>	130
Abbildung 5.28: TEM-Aufnahmen von REV-LS und DAC-LS.	133
Abbildung 5.29: Zytotoxische Wirkung von Gentamicin, von Gentamicin beladenen und mit Rhodamin markierten REV-Liposomen sowie DMSO auf die Lungenepithelzellen und Makrophagen.	134
Abbildung 5.30: Adhäsion und Aufnahme von REV-LS in U937, THP-1 und NCI-H292.	135
Abbildung 5.32: Immunfluoreszenzmikroskopie von U937 Makrophagen nach Inkubation mit Gm-beladenen DAC-LS-in.	136
Abbildung 5.33: Wirkung von freiem Gm, Gm-beladenen DAC-LS-in/ex und DAC-LS-in auf <i>Legionella</i> -Infektionen in U937-Makrophagen.	137
Abbildung 5.34: Behandlung intrazellulärer <i>Legionella</i> -Infektionen in U937 und THP-1 mit Gm-beladenen REV-LS.	139
Abbildung 6.1: Einfluss von Lp-AK (Kaninchen) bzw. humanem Immunsrum auf die Vermehrung von <i>L. pneumophila</i> in Makrophagen.	143
Abbildung 6.2: Infektion von PMNs mit <i>L. pneumophila</i>	147
Abbildung 6.3: Mögliche Funktion von RpkA während der Infektion mit <i>Legionella</i> in <i>D. discoideum</i>	156

Abbildung 6.4: Schema zum Einfluss der <i>rpkA</i> -Deletion auf den PI-Haushalt in <i>D. discoideum</i> .	157
Abbildung 6.5: Modell zur Behandlung intrazellulärer <i>Legionella</i> -Infektionen mit Liposomen der Firma Rodos BioTarget.	175
Abbildung 8.1: FACS-Analyse von PMNs, 5 h nach der Isolation aus humanem Blut.	200

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Alphabetische Auflistung verwendeter Geräte.	37
Tabelle 4.2: Alphabetische Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien.	38
Tabelle 4.3: Alphabetische Auflistung verwendeter Kits.	39
Tabelle 4.4: Alphabetische Auflistung verwendeter Chemikalien.	39
Tabelle 4.5: Alphabetische Auflistung verwendeter Antibiotika und Medienzusätze.	40
Tabelle 4.6: Alphabetische Auflistung verwendeter Primär- und Sekundärantikörper.	40
Tabelle 4.7: Alphabetische Auflistung verwendeter Bakterienstämme.	41
Tabelle 4.8: Alphabetische Auflistung verwendeter Zellen und Zell-Linien.	43
Tabelle 4.9: Alphabetische Auflistung verwendeter Gräser, Algen und Pilzstämmen.	44
Tabelle 4.10: Oligonukleotide für qRT-PCR-Studien in humanen Zellen.	61
Tabelle 4.11: Opsonisierung von <i>L. pneumophila</i> Corby.	76
Tabelle 5.1: Aufnahmerate von <i>L. pneumophila</i> in PMNs, MΦ, U937 und NCI-H292 in Abhängigkeit von verschiedenen Opsonisierungsbedingungen (mikroskopische Auswertung).	89
Tabelle 5.2: Ausgewählte Zielgene für qRT-PCR-Studien in PMNs.	92
Tabelle 5.3: Prozentualer Abbau von <i>L. hackeliae</i> und <i>L. pneumophila</i> JR32 <i>dotA</i> ⁻ in AX2 und <i>rpkA</i> ⁻ über 72 h.	103
Tabelle 5.4: Biologisches Screening von <i>B. pumilus</i> .	116
Tabelle 5.5: Antibakterielles Spektrum von Pumilacidin A, C, E, dem neuen Peptidlacton WF, „Patnam“ (Pumilacidin B-ähnliche Substanz) sowie Erythromycin.	125
Tabelle 6.1: Hemmung von <i>L. pneumophila</i> durch Peptidlactone aus <i>B. pumilus</i> .	167

8.4 FACS-Analyse

Die Isolation von PMNs erfolgte wie unter Abschnitt 4.6.4 beschrieben über einen Histopaque/Ficoll Gradienten. Anschließend wurde die Reinheit der Präparation mittels FACS (FACScalibur, BD Biosciences) bestimmt (Abbildung 8.1). Die Analyse wurde von Herrn Goldmann (HZI, Braunschweig) durchgeführt. Der umrahmte Bereich zeigt die intakte Population von PMNs an.

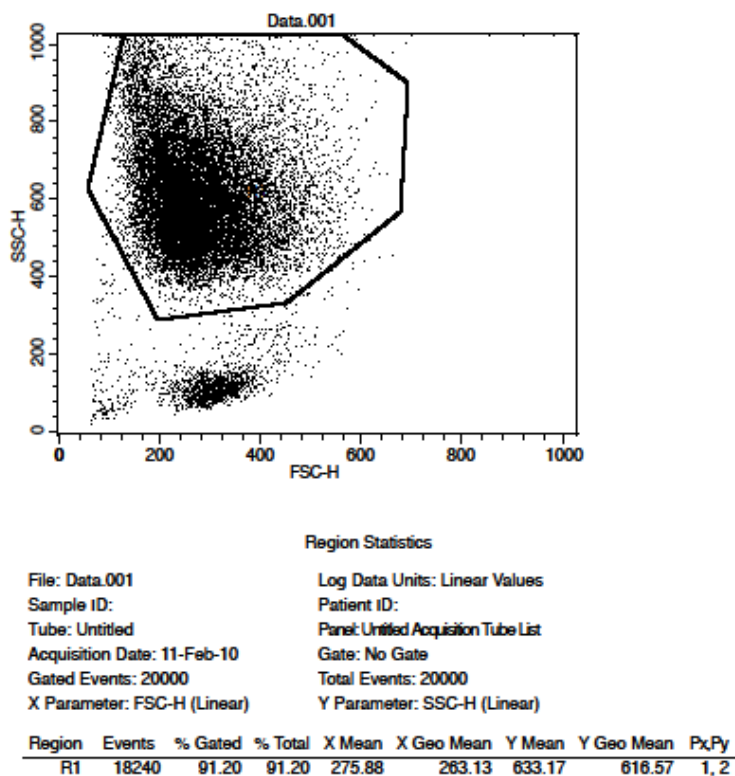


Abbildung 8.1: FACS-Analyse von PMNs, 5 h nach der Isolation aus humanem Blut.